

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft I
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. H.-D. Cremer

**Untersuchungen an Ratten über die Auswirkung
der Verfütterung von „MAILLARD“-Produkten
auf die Entstehung einer Fettleber**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Ernährungswissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Elise Cornelius
aus Uttum Kr. Norden

Gießen 1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft I
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. H.-D. Cremer

**Untersuchungen an Ratten über die Auswirkung
der Verfütterung von „MAILLARD“-Produkten
auf die Entstehung einer Fettleber**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Ernährungswissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Elise Cornelius
aus Uttum Kr. Norden

Gießen 1971

Dekan: Prof. Dr. H. Linser

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Menden

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Brune

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 9. 1971



INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Literaturübersicht	4
2.1 Chemie der MAILLARD-Reaktion	4
2.2 Ernährungsphysiologische Bedeutung der MAILLARD-Reaktion	9
2.2.1 Entstehung von Geruchs-, Geschmacks- und Farbstoffen	9
2.2.2 Einfluß der Verfütterung von MAILLARD-Produkten auf das Wachstum von Versuchstieren	11
2.2.3 Entstehung enzymresistenter Bindungen und Beeinflussung der Verdaulichkeit	12
2.2.4 Toxizität von Produkten der MAILLARD-Reaktion	16
2.3 Morphologische und biochemische Kriterien einer Fettleber	17
2.4 Entstehungsursachen der Fettleber	20
2.4.1 Toxische Leberschädigung	21
2.4.2 Stoffwechselkrankheiten und Ernährungsfaktoren außer Protein als Ursache der Fettleber	22
2.4.3 Proteinmangel als Ursache der Fettleber	24
2.4.4 Einfluß von Aminosäure-Imbalanzen auf die Lipideinlagerung in der Leber	25
2.4.4.1 Methionin und Cystin	28
2.4.4.2 Threonin	31
2.4.4.3 Lysin, Tryptophan, Arginin, Histidin	33
3. Untersuchungsmaterial und Methoden	35
3.1 Herstellung von Modellmischungen für die MAILLARD-Reaktion	35
3.2 Tiermaterial und Tierhaltung	35
3.3 Futtermischungen	36
3.4 Chemische Untersuchungsmethoden	40

3.4.1 Stickstoffbestimmung	40
3.4.2 Säurehydrolyse zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Proteinen	40
3.4.3 Alkalische Hydrolyse zur Tryptophanbestimmung in Proteinen	40
3.4.4 Enzymatische Hydrolyse zur Ermittlung der Verfügbarkeit von Aminosäuren	41
3.4.5 Säulenchromatographische Aminosäurebestimmungen an Ionenaustauscherharzen	41
3.4.6 Tryptophanbestimmung	43
3.4.7 Bestimmung des Leberfettgehaltes	43
3.4.8 Bestimmung der freien Aminosäuren im Blutplasma	44
3.5 Die histologische Untersuchung der Leber	44
3.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse	46
4. Ergebnisse und Diskussion	47
4.1 Aminosäurebestimmungen im Casein und in MAILLARD-Produkten	47
4.1.1 Bestimmung in Säure- und Alkali-Hydrolysaten	47
4.1.2 Bestimmung in enzymatischen Hydrolysaten	50
4.2 Tierversuche mit wachsenden Ratten	53
4.2.1 Gewichtsverhalten der Tiere	53
4.2.2 Futterverbrauch	63
4.2.3 Körpergewicht in Relation zum Futterverbrauch und Protein Efficiency Ratio	67
4.2.4 Lipidgehalt der Leber	72
4.2.5 Histologisch nachweisbare Veränderungen an der Leber	83
4.2.6 Veränderungen der Plasma-Aminosäuren	90
5. Zusammenfassung	98
6. Literaturverzeichnis	101

1. Einleitung und Problemstellung

Die thermische Behandlung von Proteinen kann zu vielfältigen Veränderungen führen. Während bei geringgradiger Erhitzung zunächst eine Proteindenaturierung im physikalisch-chemischen Sinne mit Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur zu beobachten ist, treten bei stärkerer thermischer Einwirkung Umsetzungen von Aminosäuren mit anderen Lebensmittelbestandteilen, insbesondere mit Kohlenhydraten in den Vordergrund. Es erfolgen irreversible Veränderungen, die bis zur teilweisen Zerstörung vor allem der basischen Aminosäuren (Lysin, Histidin, Arginin) führen können. Gleichzeitig treten neue, enzymresistente Bindungen auf. Durch diese Reaktionen kann es zu erheblichen Abnahmen der Ausnutzung und der biologischen Wertigkeit von Proteinen kommen. Ob diese Veränderung der Proteinwertigkeit allein auf eine Zerstörung oder Hemmung der Ausnutzbarkeit essentieller Aminosäuren zurückzuführen ist, oder ob eine zusätzliche toxische Wirkung neuer Reaktionsprodukte vorliegt, ist eine durchaus berechtigte Frage, zumal bekannt ist, daß bei Reaktionen zwischen Aminosäuren und reduzierenden Zuckern sehr reaktionsfähige Zwischenprodukte entstehen, wie z.B. Hydroxymethylfurfurol, Furfurol, Reduktone, Aldole, Pyridine und Pyrazine.

Um Veränderungen der Proteinqualität zu beurteilen, wird meist der Tierversuch herangezogen. Als Bewertungsmaßstab dient überwiegend die Körpergewichtszunahme wachsender Tiere pro g Futterverzehr (CAMPBELL 1961). Als Laboratoriumsmethoden wird neben mikrobiologischen Verfahren meist die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Proteine nach Säurehydrolyse herangezogen (MENDEN und CREMER 1970). Dieses Verfahren reicht allein jedoch nicht aus, da hierbei auch enzymresistente Bindungen aufgespalten werden.

Die ernährungsphysiologische Qualität eines Proteins ist nicht allein durch seinen Gehalt an essentiellen Aminosäuren begrenzt, sondern auch durch den Umfang, in dem diese durch Verdauungsenzyme freigesetzt, resorbiert und damit verfügbar werden. Die Bestimmung dieser Verfügbarkeit kann auf mikro-

biologischem Wege (FORD 1960), durch Farbstoffbindungsmethoden (CARPENTER und ELLINGER 1955) oder durch enzymatische Hydrolyse in vitro erfolgen (MENDEN und CREMER 1970).

Voraussetzung für die Anwendung und Auswertung von Laboratoriumsverfahren zur Bewertung der Veränderungen der Proteinqualität ist die Kenntnis über die optimale Aminosäurezufuhr, über die optimalen Relationen der Aminosäuren im Protein zur Deckung des Aminosäurebedarfs. Hier muß der biologische Versuch in vivo die notwendigen Grundlagen liefern. Diese Grundlagen sind bisher ungenügend. Eine der Ursachen hierfür ist darin zu suchen, daß - wie im Vorhergehenden festgestellt - im Tierversuch fast ausschließlich der Wachstumstest und die Zunahme des Körpergewichts als Kriterium für die Qualität eines Proteins dient.

Sicherlich ist das Wachstum ein empfindliches und meist brauchbares Instrument. Dennoch muß seine Anwendbarkeit insbesondere dann angezweifelt werden, wenn nicht sicher differenziert werden kann, ob die Zunahme des Körpergewichts auf die Synthese körpereigener Proteine oder zum Beispiel auch auf unphysiologische Einlagerung von Fett zurückzuführen ist. Bei vermehrter Fetteinlagerung müßte, trotz Zunahme des Körpergewichts, auf eine schlechte Proteinqualität geschlossen werden.

Als besonders empfindliches Organ für eine erhöhte Fetteinlagerung nach Fehl- oder Mangelernährung darf die Leber gelten. Proteinmangel, Aminosäure-Imbalancen und Mangel an lipotropen Substanzen führen im Tierexperiment zu Lipidanreicherungen in der Leber. Bei Kwashiorkor, einer Proteinmangelkrankheit bei Kindern, tritt die "Fettleber" als Begleiterscheinung auf. Obwohl einige Autoren den Begriff der "ernährungsbedingten" Leberschädigung ablehnen (RUBIN und LIEBER 1968), sehen wir daher in Übereinstimmung mit anderen Verfassern in der Untersuchung der Fetteinlagerung in der Leber einen weiteren brauchbaren Index für eine adäquate Aminosäurezufuhr. Fast jede ernährungsbedingte Abnormalität wird an morphofunktionellen Abweichungen der Leber sichtbar (PORTA et al. 1970).

In früheren Versuchen an Ratten hatten wir in Übereinstimmung mit anderen Autoren eine Verminderung der Körpergewichtszunahme pro g Futterverzehr und damit eine Verschlechterung der Proteinqualität durch eine nichtenzymatische Bräunungsreaktion von Casein nach Erhitzung mit Glukose gefunden. Trotz eines hohen Proteingehalts im Futter der Versuchstiere (18 %) stellten wir dabei eine erheblich erhöhte Fetteinlagerung in der Leber der Versuchstiere fest. Eine Zulage der nach den Ergebnissen der Aminosäureanalyse besonders geschädigten essentiellen Aminosäuren führte zwar zu einer deutlichen Verbesserung der Körpergewichtszunahme pro g Futterverzehr, gleichzeitig aber auch zu einer verstärkten Fettleber (MENDEN et al. 1970). Diese Beobachtung war bisher aus der Literatur nicht bekannt. Lediglich WEAST et al. (1948) wiesen in Versuchen mit Hunden auf eine gelbliche Verfärbung der Leber nach Fütterung mit hitzege-schädigtem Casein hin, führten jedoch keine histologischen und chemischen Untersuchungen durch.

Die vorliegende Arbeit hatte zur Aufgabe, diese bei Verfütterung von Bräunungsprodukten aus Casein und Glukose bei einem relativ hohen Proteingehalt von 18 % an Ratten auftretende Leberverfettung chemisch und histologisch zu charakterisieren. Weiterhin sollte versucht werden, nach den Ergebnissen der Untersuchung von Säure-, alkalischen und enzymatischen Hydrolysaten der Bräunungsprodukte sowie von Plasma-Aminosäurebestimmungen bei den Versuchstieren eine Aufwertung des hitzege-schädigten Proteins mit Aminosäuren zu finden, die nicht nur zu optimaler Körpergewichtszunahme pro g Futterverzehr, sondern auch zu normalem Fettgehalt der Leber führt.

2. Literaturübersicht

2.1 Chemie der MAILLARD-Reaktion

Unter den verschiedenen Ursachen von Hitzeschädigung von Proteinen treten als wichtigste die unter dem Begriff der nichtenzymatischen Bräunungsreaktion zusammengefaßten Umsetzungen von Aminosäuren mit anderen Nahrungsbestandteilen hervor.

Bräunungsreaktionen gehören zu den Abläufen in der Natur, die häufig und in größtem Ausmaß auftreten (z.B. bei Vermoderungsvorgängen, Torf- und Braunkohlebildung).

Der von MAILLARD erstmalig beschriebenen und auch nach ihm benannten nichtenzymatischen Bräunungsreaktion zwischen Proteinen und reduzierenden Zuckern kommt hierbei die größte Bedeutung zu (MAILLARD 1912, 1913, 1916, 1917).

MAILLARD fand, daß bei Erhitzen von Glukose mit Glycin die Glukose dehydratisiert und Glycin durch CO_2 -Abspaltung decarboxyliert wird. Dies wurde in neueren Arbeiten von STADTMAN et al. (1952) sowie WOLFROM et al. (1953) bestätigt. MAILLARD stellte eine Abnahme der Bräunungsaktivität verschiedener Aminosäuren in dieser Reihenfolge fest: Alanin, Glycin, Glutaminsäure, Leucin, Sarcosin, Tyrosin. Diese Reihe wird von HEYNS und PAULSEN (1960) durch die basischen Aminosäuren, die am ehesten einer Bräunungsreaktion unterliegen, ergänzt: Lysin, Tryptophan, Histidin, Arginin. Die Reihenfolge der Zucker, die eine Bräunungsreaktion eingehen, entspricht nach der heutigen Auffassung der Reaktionsfähigkeit, mit der die entsprechenden Aldosen eine Amadori-Umlagerung eingehen.

Nach ERBERSDOBLER (1967) verläuft die Initialreaktion der MAILLARD-Reaktion nach folgendem Schema:

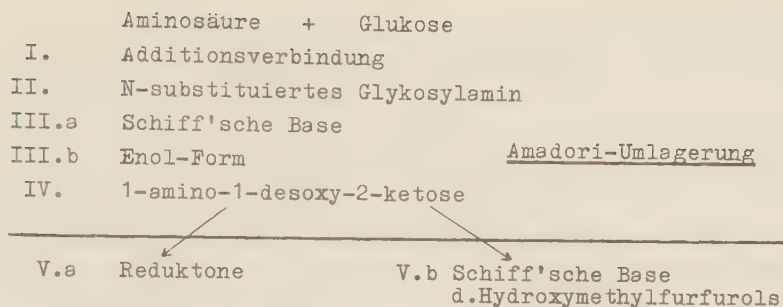


Abb. 1: Initialreaktion der MAILLARD-Umsetzung bei Erhitzung von Aminosäuren mit Glukose

Die Aminosäure und Glukose kondensieren über eine Additionsverbindung und unter Bildung eines N-substituierten Glykosylamins zur Schiff'schen Base. Die anschließende Amadori-Umlagerung stellt eine entscheidende Zwischenstufe im Verlauf der Bräunungsreaktion dar. Sobald über die ablaufende Amadori-Umlagerung die Bildung labiler Zwischenstufen eingeleitet wird, tritt meist schnell Bräunung ein. Die weitere Umsetzung der entstandenen 1-amino-1-desoxy-2-ketose kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Der wichtigste Weg ist die Dehydratisierung zur Schiff'schen Base des Hydroxymethylfurfurols. Ein zweiter Weg der Dehydratisierung führt zur Bildung von Reduktonen. Außerdem kann die 1-amino-1-desoxy-2-ketose in kleinere Bruchstücke gespalten werden. Ein weiterer Abbauweg ist der Strecker-Abbau, wobei α -Aminosäuren unter Decarboxylierung zum Aldehyd abgebaut werden. Diese Aldehyde können unter Bildung brauner Farbstoffe mit Aldiminen und anderen Spaltprodukten kondensieren.

Eine zusammenfassende Darstellung des Ablaufs von nicht-enzymatischen Bräunungsreaktionen wurde von HODGE (1953) mitgeteilt.

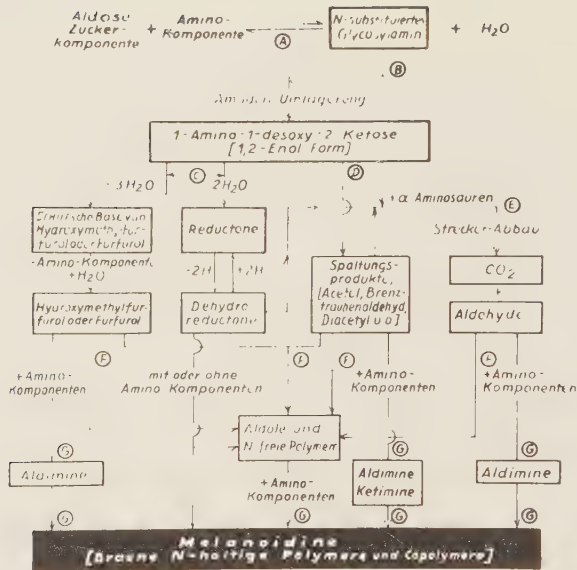


Abb. 2: Reaktionsschema für die MAILLARD-Reaktion nach HODGE (1953)

Im Endstadium der Bräunungsreaktion polymerisieren die Zwischenprodukte unter Bildung dunkelbraun gefärbter hochmolekularer sogenannter "Melanoidine". Diese Polymerisate zeigen mit zunehmendem Kondensationsgrad wachsende Unlöslichkeit. Die kleinste bisher feststellbare Molekulargröße eines Standardmelanoidins (Glukose-Glycin) lag bei 1180. Melanoidine aus Serumalbumin und Glukose haben Molekulargewichte über 30.000.

Besonderes Interesse, auch im Hinblick auf eine mögliche physiologische Wirksamkeit, beanspruchen die bei der Bräunungsreaktion auftretenden Zwischenprodukte. Die Zahl der Verbindungsmöglichkeiten ist außerordentlich hoch. Schon bei einem einfachen Reaktionsgemisch Glukose-Glycin wurden 24 Verbindungen nachgewiesen (HANNAN und LEA 1952).

Nach HÖLTERMAND (1966) entstehen Verbindungen, bei denen auf einen Teil Aminosäure ein oder mehrere Zuckeranteile entfallen, deren Zahl durch die Natur der Aminosäure bestimmt wird.

In letzter Zeit konzentrierte sich das Interesse auf Abbau-
produkte oder Additionsverbindungen des Lysins, dessen Schä-
digung bei der Bräunungsreaktion aus ernährungsphysiologi-
schen Gründen von besonderer Bedeutung ist. So fanden **ERBERS-**
DOBLER und **ZUCKER** (1966) bei der säulenchromatographischen
Auftrennung von hitzegeschädigten Milchpulverproben nach
der Elution des Arginin eine ninhydrinpositive Substanz,
die eine Stunde nach Passieren des Arginin im Chromatogramm
erschien. Sie wurde mit zunehmender Hitzeschädigung **ver-**
mehrt gebildet. Die Autoren vermuteten, daß es sich hierbei
um das Reaktionsprodukt einer Glukose-Lysin-Kondensation
handelt. Weitere Untersuchungen von **BRÜGGEMANN** und **ERBERS-**
DOBLER (1968) zur Identifizierung dieser Substanz wiesen
auf Fructoselysin als Ausgangsprodukt hin, das bei der Er-
hitzung von Glukose mit Lysin gebildet wird. Bei der Hydro-
lyse von Fructoselysin mit 6n HCl entsteht eine Substanz,
die bei der säulenchromatographischen Aminosäureanalyse
ebenfalls nach Arginin eluiert wird.

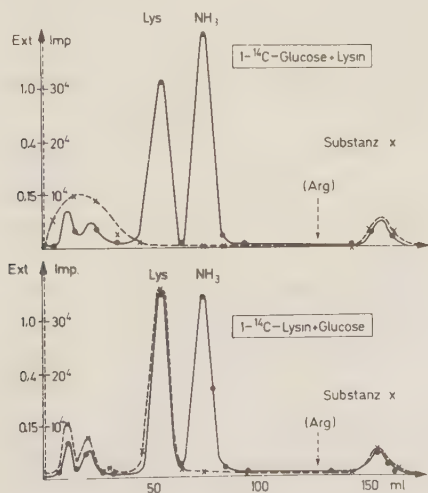
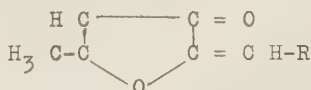


Abb. 3: Lysin zusammen mit Glukose und Wasser erhitzt,
Chromatogramm der basischen Aminosäuren aus dem
Hydrolysat. --- Extinktion (Ninhydrinreaktion); ---
Imp/ml/min (soll insgesamt 880 000)
(**BRÜGGEMANN** und **ERBERSDOBLER** 1968)

FREIMUTH und TRÜBSBACH (1968), die bei säulenchromatographischer Aminosäureanalyse der Säurehydrolysate von MAILLARD-Produkten ebenfalls nach der Elution des Arginin das Auftreten eines zusätzlichen Gipfels beobachteten, stellten diese Verbindung durch Erhitzen von Laktose mit Lysin dar. Sie schreiben ihr auf Grund verschiedener Identitätsreaktionen folgende Formel zu:



Die MAILLARD-Reaktion von β -Lactoglobulin mit Laktose bewirkt bei einem Feuchtigkeitsgehalt der Gemische von 10% eine Abnahme des Lysingehalts nach 40-tägiger Lagerung bei 37°C um etwa 30%, nach Erhitzung auf 55°C für 4 Tage bzw. auf 96°C für 4 Std. um etwa 40% (FREIMUTH und TRÜBSBACH 1969a). Die Bestimmung der Teilchengröße von β -Lactoglobulin nach der Reaktion mit Laktose zeigt eine geringfügige Erhöhung des Molekulargewichts des Proteins, die auf Bindung von Kohlenhydratresten zurückzuführen ist (FREIMUTH und TRÜBSBACH 1969b). Ausführliche Darstellungen des Chemismus der MAILLARD-Reaktion sind von DANEHY und PIGMAN (1951), HODGE (1953), ELLIS und HONEYMAN (1955) und REYNOLDS (1963) erschienen.

Die Bedingungen, unter denen eine Bräunungsreaktion in Lebensmitteln abläuft, verzögert oder beschleunigt wird, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Eine Bräunungsreaktion zwischen Proteinen und reduzierenden Kohlenhydraten kann bereits bei normaler Zimmertemperatur stattfinden. Die Bildung von Melanoidinen nimmt jedoch bei Erhöhung der Temperatur und parallel zur Zeitdauer der Erhitzung zu. Bei 0°C gehen die Veränderungen selbst nach Monaten nur sehr langsam vor sich, oberhalb 90°C sehr rasch. Eine Steigerung der Lagertemperatur um das 4-fache kann die Reaktionsgeschwindigkeit um das 4-fache erhöhen.

Kurze Erhitzung auf hohe Temperaturen führt in höherem Umfang zu irreversiblen Veränderungen als längere Erhitzung auf niedrigere Temperaturen.

Der Feuchtigkeitsgehalt beeinflusst den Verlauf der Reaktion wesentlich. Ein H_2O -Gehalt von 5 - 10% ist für den Reaktionsverlauf optimal, unter 3% erfolgt nahezu Stillstand, über 10% eine deutliche Verlangsamung.

Eine Beschleunigung des Reaktionsablaufs tritt durch Verschiebung des pH nach der alkalischen Seite ein (MENDEN 1970).

2.2 Ernährungsphysiologische Bedeutung der MAILLARD-Reaktion

2.2.1 Entstehung von Geruchs-, Geschmacks- und Farbstoffen

Es ist bekannt und in vielen Fällen erwünscht, daß die Umsetzung zwischen Aminosäuren und reduzierenden Zuckern neben Farbveränderungen zu Geruchs- und Geschmacksveränderungen führt. So sind z.B. die typischen Aromastoffe der Brotkruste Produkte der Bräunungsreaktion. Bei Versuchen, diese Aromastoffe auf synthetischem Wege herzustellen, wurden 20 verschiedene Aminosäuren und 8 verschiedene Zucker in verschiedenem Mischungsverhältnis erhitzt. Dabei wurde festgestellt, daß sich die Zucker (Glukose, Fruktose, Maltose, Saccharose, Arabinose, Ribose, Xylose und Rhamnose) in der aromabildenden Wirkung kaum unterscheiden. In Gegenwart von Leucin, Histidin und Arginin war das auftretende Geschmacksbild am brotähnlichsten (KIELEY et al. 1960).

Das Rösten von proteinhaltigen Lebensmitteln mit Kohlenhydraten führt zur Bildung von Pyrazinen (DAVIDSON und WIGGINS 1956, DAWES und EDWARDS 1966, KOEHLER et al. 1969). Pyrazine sind wiederum charakteristische Bestandteile der Aromafractionen von Kaffee, Cocoa, Erdnuß und Kartoffelchips (MARION et al. 1967, GOLDMAN et al. 1967, RIZZI 1967, BONDOROVICH et al. 1967, MASON et al. 1967).

Die Braunfärbung beim Erhitzen von Schweinefleisch ist ebenfalls auf eine Bräunungsreaktion zurückzuführen (PEARSON et al. 1966). Dieselbe ist auch verantwortlich für die braune Verfärbung von getrocknetem Fleisch (HENDRICKSON et al. 1955) und bei gefriergetrocknetem Fisch (TARR et al. 1955). Nach Versuchen an Muskelextrakten von gereiftem und fri-

schem Fleisch soll freie Ribose in Extrakten von gereiftem Fleisch die Bräunung und Aromabildung hervorrufen (WOOD 1961). Zusammenfassend ist festzustellen, daß die nicht-flüchtigen Bräunungsprodukte mit reduzierenden Zuckern bei zahlreichen Aminosäuren typische Geschmackseffekte zeigen, die an das Aroma bestimmter erhitzter Lebensmittel erinnern und darauf schließen lassen, daß die unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung der Lebensmittel für die unterschiedliche Geschmacksbildung beim Erhitzen verantwortlich ist (ROTHE 1963).

Oft hat die Bräunungsreaktion auch unerwünschte Geruchs- und Geschmacksveränderungen zur Folge.

Zu irreversiblen Aroma- und Geschmacksverlusten kommt es beim Lagern von Tomatenerzeugnissen und Zitruskonzentraten (LANGE 1961). Ebenso sind Geschmacksveränderungen von dehydrierten Orangensaftkristallen bei längerer Lagerung auf die Bildung nichtenzymatischer Bräunungsprodukte zurückgeführt worden (BERRY und TATUM 1965).

Farbveränderungen zeigten sich an Weizenkeimen; mit steigendem Wassergehalt wurde die Verfärbung stärker bis zu einem dunkelbraunen bis schwarzen Aussehen (POMMERANZ und SHELLEN-BERGER 1961). Auch die Verfärbung von Konserven in den Tropen durch zu starke Bräunungs- und Schwärzungsreaktionen bei der Produktion von Backwaren oder Fleischerzeugnissen ist in diesem Zusammenhang anzuführen. Man hat daher nach Hemmstoffen gesucht, um die Reaktion nach Wunsch zu beeinflussen. Wie nach Betrachtung der zum Eintritt einer Bräunungsreaktion führenden chemischen Vorgänge zu erwarten war, erwiesen sich hierbei vor allem Carbonylreagentien als Inhibitoren der Bräunungsreaktion, z.B. Mercaptane und Bisulfite. In diesem Zusammenhang ist auch die Anwendung von SO_2 in begrenzter Menge zu nennen, die ebenfalls den Eintritt einer unerwünschten Bräunungsreaktion hemmen kann. Natürlich kann man in den Verlauf der Reaktion auch dadurch eingreifen, daß man die Reaktionsbedingungen ungünstig macht, z.B. durch Verschiebung des pH nach dem sauren Bereich, durch Herabsetzung von Temperatur und Wassergehalt oder durch Herauslösen von reagierenden Stoffen, meist löslichem Zucker (MENDEN 1970).

2.2.2 Einfluß der Verfütterung von MAILLARD-Produkten auf das Wachstum von Versuchstieren

MORGAN (1931) beobachtete bei Versuchen an jungen Ratten, die erhitztes Weizengluten erhielten, ein vermindertes Wachstum. Bei einem Proteingehalt von 18, 24 oder 36% wurde auch das Wachstum von Hunden, die erhitztes Protein erhielten, verzögert. Eine Zugabe von L-Lysin-HCl verbesserte das Wachstum, ebenfalls ein Zusatz von Lactalbumin. Bei den Tieren mit erhitztem Protein war der Gesamt-Serumproteinspiegel sowie der Albuminspiegel vermindert, während der Globulinhalt unverändert blieb. Ebenso war eine geringe Verminderung der Hämoglobin-Konzentration zu beobachten. Tiere, die mit stark erhitztem Casein (200°C) gefüttert wurden, wiesen einen niedrigen Herz- und Muskelkreatinspiegel auf sowie gelblich verfettete Leber, die die Autoren auf Methioninmangel zurückführten. Eine chemische und histologische Untersuchung der Leber erfolgte nicht (WEAST et al. 1948).

GREAVES et al. (1938) führten Versuche an Ratten durch, die ebenfalls erhitztes Casein (30 min. 140°C) bei einem Proteingehalt des Futters von 9 - 18% erhielten. Die biologische Wertigkeit des erhitzten Caseins sank um 17% gegenüber dem normalen Casein, die Verdaulichkeit verminderte sich um 4%. Ein Zusatz von Lysin verbesserte die biologische Wertigkeit von 57 (erhitztes Casein) auf 64, während die Verdaulichkeit leicht verschlechtert wurde. Zusatz von Tyrosin verminderte die Verdaulichkeit ebenfalls, Cystin-Zusatz erhöhte die biologische Wertigkeit.

In Versuchen an jungen Raten und Küken (BALDWIN et al. 1951, EVANS et al. 1948, 1949), die hitzegeschädigtes Protein erhielten, konnte durch Zulage von Lysin die Nährwertverminderung teilweise kompensiert werden. Es gelang nicht, die Nährwertverminderung durch Aminosäure-Zulage voll auszugleichen.

In Wachstumsversuchen mit einer Methionin-Fructose-Verbindung zeigte diese Substanz, mikrobiologisch geprüft, nur 80% der wachstumsfördernden Wirkung des Methionin. Im Versuch an Ratten erwies sich praktisch kein Methionin verfü-

bar (HORN et al. 1968). In weiteren Versuchen mit erhitztem Casein an Ratten traten ebenfalls Wachstumsstörungen auf. Ratten von Müttern, die erhitztes Casein erhielten, wurden 120 Tage mit derselben Kost ernährt. Die Tiere zeigten ein bei der Entwöhnung einsetzendes verzögertes Wachstum. Außerdem ergab die mikroskopische Untersuchung der Tibien dieser Tiere eine abnormale Topographie an 21 und 29 Tage alten Ratten, die sich im Alter von 60 Tagen allmählich wieder normalisierte. Die während der Wachstumshemmung auftretenden Veränderungen sind offenbar reversibel und werden ohne Zusatz zum Futter korrigiert (KOYOUNDJISKY et al. 1964).

Nach DÜMMER (1970) betrug die Gewichtszunahme wachsender Ratten, die mit hitzegeschädigtem Protein gefüttert wurden, in 3 Wochen nur 12 g gegenüber 84 g bei der Kontrollgruppe.

2.2.3 Entstehung enzymresistenter Bindungen und Beeinflussung der Verdaulichkeit

Wie aus den Ergebnissen von Wachstumsversuchen hervorgeht, führt die Bräunungsreaktion zwischen Proteinen und reduzierenden Zuckern zu einer verminderten biologischen Wertigkeit. Diese Verminderung wird vermutlich durch eine Herabsetzung der Verdaulichkeit, durch eine verlangsamte enzymatische Freisetzung oder auch teilweise Zerstörung einzelner essentieller Aminosäuren hervorgerufen. WEAST et al. (1948) stellten eine Verminderung der scheinbaren Verdaulichkeit von erhitztem Casein bei 200°C auf 28 und bei 140°C auf 67 gegenüber nicht behandeltem von 91 fest. LANG et al. (1960) fanden im Kot von Ratten eine erhöhte Ausscheidung N-haltiger Substanzen bei Verfütterung von Bräunungsprodukten. Sie vermuteten eine Beteiligung von Darmbakterien.

Nach NESHEIM und CARPENTER (1967) bleibt hitzezerstörtes Protein unverdaut im Dünndarm zurück, wird aber danach durch Fermentation im Caecum desaminiert. Dadurch können die Werte der Verdaulichkeit für Stickstoff und Aminosäuren irreführend hoch liegen. DÜMMER (1970), der für die relative Verfügbarkeit der Aminosäuren niedrigere Werte fand als für die "Verdaulichkeit", führte dies ebenfalls auf die Umsetzung des unverdaulichen Proteins und eine Desaminierung einzelner Aminosäuren durch die Mikroorganismen im Caecum und Colon zurück.

Auch in vitro Versuche von ERBERSDOBLER et al. (1970) bestätigten diese Auffassung. Sie zeigten, daß die Mikroorganismen im Verdauungstrakt (Ratte) in der Lage sind, das für Wirbeltiere nicht verwertbare Fructoselysin abzubauen und zu deaminieren. Schließlich wird dies Konzept durch die kürzlich veröffentlichten Arbeiten von VALLE-RIESTRA und BARNES (1970) unterstützt. Bei Ratten, die Antibiotica erhielten, war nach Verfütterung von Bräunungsprodukten die Ausscheidung markierter Substanzen (von C¹⁴ - Lysin - HCl stammend) signifikant höher als bei nichtbehandelten Tieren. Dies führen die Verfasser auf eine größere bakterielle Proteolyse bei den nicht behandelten Ratten zurück. Damit wird erneut die Annahme bestätigt, daß die Intestinalflora die scheinbare Verdaulichkeit hitzegeschädigten Proteins erhöhen kann.

Die Ursache für die verminderte Verdaulichkeit hitzegeschädigter Proteine dürfte in der Bildung enzymresistenter Bindungen liegen, wie die Ergebnisse einer Reihe von Autoren unter Beweis gestellt haben.

LEA und HANNAN (1950) ließen Casein bei 37°C (pH 6,3) für 30 Tage mit Glukose reagieren. Dabei gingen über 90% des Lysins eine neue Verbindung ein. Auch Arginin (70%), Histidin (30%), Methionin (50%) und Tyrosin (30%) hatten sich mit der Glukose zu neuen Verbindungen umgesetzt. Zwei Drittel des gebundenen Lysins und das gesamte gebundene Methionin wurden nach Säurehydrolyse wiedergefunden, während dies bei Arginin und Histidin nicht möglich war.

N.N. RAO und McLAUGHLAN (1967) erhitzten Casein mit Glukose und Wasser (2:2:1) im Autoklaven. Durch die Hitzebehandlung wurde der Gehalt an verfügbarem Lysin um 65 - 68%, der Gehalt an Methionin um 39 - 47% vermindert.

DUMMER (1970) stellte fest, daß die Aminosäurekonzentration im Pfortaderblut von Ratten nach Verfütterung von hitzegeschädigtem Protein vermindert war gegenüber dem Gehalt an freien Aminosäuren nach Fütterung des Kontrollproteins. Nach Erhitzen von Casein mit Glukose auf 105°C wurde von den essentiellen Aminosäuren Lysin am stärksten geschädigt. Darauf folgten in abnehmender Reihenfolge: Arginin, Methionin, Threonin, Histidin, Isoleucin. Geringer war die Schädigung

bei Valin, Leucin, Phenylalanin und Tyrosin. Durch Autoklavieren von Casein mit Glukose (30 min. 138°C) wurden vor allem Lysin, Arginin, Threonin, Histidin und Valin in Mitleidenschaft gezogen. Der Autor beobachtete, daß Methionin durch Erhitzen im Luftstrom stärker geschädigt wurde als durch Erhitzen im Autoklaven. Ähnliche Ergebnisse wurden von anderen Autoren mitgeteilt (PATTON et al. 1947, BALDWIN et al. 1951). Zahlreiche Versuche haben gezeigt, daß die übliche Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse keinen zuverlässigen Aufschluß über die ernährungsphysiologische Wirkung hitzgeschädigter Proteine gibt (LEA und HANNAN 1950, RIESEN et al. 1947, MAURON et al. 1955, MENDEN und CREMER 1966).

MENDEN und CREMER (1966) fanden nach Säurehydrolyse von Casein-Glukose-Bräunungsprodukten eine teilweise Zerstörung von Lysin und Arginin. Ebenfalls geschädigt, wenn auch schwächer, waren Methionin und Tyrosin. Die enzymatische Hydrolyse ergab dagegen eine signifikante Verminderung der Verfügbarkeit aller Aminosäuren außer Threonin. Daraus schließen die Autoren, daß enzymresistente Bindungen entstehen, die durch die Säurehydrolyse gespalten werden. Diese Tatsache unterstreicht die Notwendigkeit, zur Beurteilung ernährungsphysiologischer Wirkungen von Bräunungsprodukten neben chemischen auch enzymatische und biologische Methoden heranzuziehen. Hier spielt die Verfügbarkeit der Aminosäuren eine ausschlaggebende Rolle.

Der von MAURON (1961) geprägte Begriff der Aminosäureverfügbarkeit gibt die Menge in Prozent der Aminosäure im Futter an, die für die Proteinsynthese im Organismus ausgenutzt wird und zwar unter der Bedingung, daß diese Aminosäure der einzige limitierende Faktor im Futter ist. Diese Definition wurde von MENDEN und CREMER (1970) dahingehend erweitert, daß sie nicht nur auf die Menge der l i m i t i e r e n d e n Aminosäure, die dem Organismus zur Ausnutzung in der Proteinsynthese zur Verfügung steht, bezogen wird, sondern auf alle essentiellen Aminosäuren.

Ein wichtiger Schritt für die Verfügbarkeit von Aminosäuren ist die intestinale Resorption. Verfügbarkeit und Ausnutzung wären damit zu trennen. Die Verfügbarkeit von Aminosäuren ist

Vorbedingung für die Ausnutzung, bedeutet jedoch nicht, daß eine bestimmte Aminosäure auch vollständig ausgenutzt wird. Dies kann wiederum verschiedene Ursachen haben, z.B. Mangel an einzelnen essentiellen Aminosäuren oder Aminosäureimbilanzen.

Eine gewisse Einschränkung erhält die Bedeutung des Resorptionsfaktors durch die von KRUG (1960) sowie VALLE-RIESTRA und BARNES (1970) mitgeteilten Versuchsergebnisse. KRUG fand bei Ratten eine um das Dreifache erhöhte Ausscheidung von Aminosäuren im Harn gegenüber den Kontrolltieren nach Verfütterung von Bräunungsprodukten. Eine ebenfalls um das Dreifache erhöhte Ausscheidung einer radioaktiven Substanz stellten VALLE-RIESTRA und BARNES bei Ratten fest, die ein MAILLARD-Produkt aus Ei-Albumin mit ^{14}C - Lysin - HCl erhielten. Die Autoren führen dies auf die Bildung eines ϵ -N-Lysin-Produktes zurück, das nicht ausgenutzt werden kann und im Urin ausgeschieden wird. Eine andere Erklärung für die erhöhte Ausscheidung im Harn, die natürlich vorhergehende Resorption voraussetzt, könnte im Auftreten von Aminosäure-imbilanzen liegen, die eine Änderung der Aminosäureausnutzung bewirken.

Die chemischen Reaktionen, die zur Bildung enzymresistenter Bindungen führen, sind noch nicht völlig geklärt. Zum Teil wurde in Kapitel 2.1 darauf eingegangen. In Versuchen mit ernährungsphysiologischer Fragestellung wird immer wieder auf die Bedeutung des Lysins hierbei hingewiesen. Fütterungsversuche mit Hühnern haben gezeigt, daß eine Korrelation zwischen Nährwert und der Lysinmenge mit freien ϵ -NH₂-Gruppen besteht (STEWART 1960). SURE (1953) führte die verminderte "protein efficiency" durch Erhitzen von Baumwollsaat auf eine verminderte Verfügbarkeit von Lysin und Methionin zurück. Bei Hitzebehandlung von Sonnenblumensaad wird die Verfügbarkeit von Lysin und Arginin vermindert (RENNER et al. 1953). Bei Soja wird durch starkes Erhitzen Lysin und Arginin weniger verfügbar (RIESEN et al. 1947). Das verfügbare Lysin wurde in diesen Versuchen nach CARPENTER et al. (1955) mit der Dinitrofluorbenzolmethode bestimmt (FDNB-Methode). ELDRED und RODNEY (1945) haben bereits die verminderte Verfügbarkeit von Lysin vor allem auf die Bildung enzymresistenter Bindun-

gen zwischen der ε - Amino-Gruppe und anderen unspezifischen Reaktionsgruppen zurückgeführt.

Nach STEWART (1960) kann eine Verminderung des Nährwertes bei Hitzeschädigung auftreten durch:

1. Bildung enzymresistenter Additionsverbindungen des Proteins, durch intramolekulare Umgruppierungen oder durch Verbindungen besonders reaktionsfähiger Gruppen mit reduzierenden Zuckern.
2. Bildung metabolisch nicht verfügbarer Derivate von freien Aminosäuren mit anderen Nahrungsbestandteilen.
3. Zerstörung von Aminosäuren

In neueren Versuchen von BJARNSON et al. (1970) wird aus der Korrelation der Abnahme von Lysin, Entwicklung von NH_3 und Veränderungen in der Amidkonzentration der Schluß gezogen, daß die ε -Aminogruppe von Lysin mit den Amidgruppen von Asparagin und Glutamin reagiert. Diese Reaktion darf aber sicherlich - im Vergleich zur Reaktion von Lysin mit reduzierenden Zuckern - nur als Nebenreaktion gewertet werden.

2.2.4 Toxizität von Produkten der MAILLARD-Reaktion

In Versuchen über die Toxizität von MAILLARD-Produkten stellten LANG et al. (1960) fest, daß nach Erhitzen eines Gemisches aus 25% einer Aminosäure mit 75% Glukose die LD_{50} des erhitzten Produkts gegenüber dem unerhitzten Gemisch erniedrigt wird. Das weist darauf hin, daß bei Erhitzungen von Aminosäuren mit Glukose Substanzen entstehen, deren Toxizität größer ist als die der Ausgangsaminosäure. Die Verminderung des Nährwertes durch die Zerstörung einer Aminosäure kann nach LANG et al. bei dieser Versuchsanordnung keine Rolle spielen. Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, stieg die Toxizität von Histidin und Methionin auf das Doppelte, die von Lysin auf das Vierfache an.

Tabelle 1: LD_{50} erhitzter Gemische aus Aminosäuren und Glukose

Aminosäure im Gemisch	LD_{50} g/kg Maus
Unerhitzte Gemische	über 20 g
L-Histidin-HCl	7,6 (4,7)
L-Lysin-HCl	4,15 (4,8)
L-Methionin	8,5 (4,3)
DL-Tryptophan	6,1 (1,6)
L-Tyrosin	11,2
DL-Valin	8,2 (5,4)

Nach K.LANG et al. (1960)

Die Autoren vermuten auf Grund von Fütterungs- und Stoffwechselversuchen, daß MAILLARD-Produkte vielleicht im Sinne von Stoffwechselantagonisten wirken. Derselben Ansicht ist auch KRUG (1960), der die Verbindung zwischen Aminosäuren und Kohlenhydraten als Träger einer "Antiaminosäurewirkung" betrachtet.

Ein stets nachweisbares Zwischenprodukt der Bräunungsreaktion mit großer Reaktionsbereitschaft ist das 5-Hydroxymethylfurfurol (HMF).

Mögliche Auswirkungen der Verfütterung dieser Verbindung auf den Leberstoffwechsel der Versuchstiere wurden von LANG et al. (1970) an Ratten untersucht. Hierbei ergaben sich keine entzündlichen oder degenerativen Veränderungen im Leberparenchym.

CZOK (1970) untersuchte die pharmakologische Wirkung von HMF. Durch orale Gaben von 50, 100, 200 mg/kg HMF war eine dosisabhängige Steigerung der Spontanaktivität und Darmmotorik von Mäusen sowie eine Zunahme der Galleausscheidung von Ratten zu erzielen. LANG und BICKEL (1970) prüften HMF auf cytotoxische Wirkungen an Hühnerembryonen-Fibroblasten. Bei einer Konzentration von 0,1 mg HMF/ml Nährmedium wurden keine cytotoxischen Wirkungen festgestellt. HMF besitzt demnach nur eine schwache Toxizität, was im Einklang mit von LANG et al. (1960) unter anderer Methodik durchgeführten Versuchen steht.

Weitere Untersuchungen über eine toxische, insbesondere eine den Stoffwechsel der Leber beeinflussende Wirkung von MAILLARD-Produkten, ließen sich der ernährungswissenschaftlichen Literatur der letzten Zeit nicht entnehmen.

2.3 Morphologische und biochemische Kriterien einer Fettleber

Der Befund einer "Fettleber" ist in der medizinischen Diagnostik häufig anzutreffen. Leitsymptom ist die vergrößerte Leber. Die Ursache hierfür kann vielschichtig sein. Über die Frage, ob erhöhte Fettansammlungen in der Leber lediglich eine Art Schönheitsfehler ohne Beeinträchtigung der Organfunktion sind oder ob sie Krankheitswert haben, wird immer wieder diskutiert. In jedem Falle - ob reversibel oder irreversibel - dürfte es sich um eine Stoffwechselstörung handeln, die in starkem Maße von der Ernährung beeinflusst wird

und daher als weiterer Parameter für die Untersuchungen der richtigen oder falschen Zusammensetzung einer Ernährung gelten kann.

Bei allen Erörterungen zeigt sich immer wieder, daß die Begriffsbestimmung der Fettleber eine entscheidende Frage ist. Für die Beurteilung spielen morphologische und biochemische Untersuchungen eine ausschlaggebende Rolle.

Die Leberzellen enthalten normalerweise außer dem Strukturfett leicht extrahierbare Fettstoffe, die in der üblichen Weise histologisch nicht nachweisbar sind. Große Fett-Tropfen können nicht zustandekommen, wenn die Zelle außer vermehrtem Neutralfett ausreichend Phosphatide und Cholesterin enthält. Als physiologische Fettablagerungen sind feinste Tröpfchen an der Leberzellperipherie anzusehen, die z.B. bei saugenden Jungtieren einige Stunden nach der Verdauung auftreten (CAIN 1967). Das Fett verteilt sich später über den ganzen Zell-Leib.

Von einer Fettleber spricht man im pathologisch-anatomischen Sinne nur dann, wenn 50% der Leberzellen verfettet sind. Dabei wird die Verfettung nur aus Hämatoxylin-Eosin-Präparaten mit Vakuolenbildung abgeschätzt. Leberverfettungen, die nur 10-20% der Zellen betreffen, werden nicht als pathologisches Substrat einer Fettleber angesehen.

Im histologischen Schnittpräparat treten Fett-Tropfen bei einem Fettgehalt über 10-12% des Trockengewichts oder 5-6% des Leberfeuchtgewichts in Erscheinung (THEUER 1968). Die Bestimmung des Fettgehaltes erfolgt durch Extraktion mit Petroläther nach SOXHLETT. 10 - 25% des Leberfeuchtgewichtes sprechen für eine mäßiggradige Verfettung. Sind mehr als 50% der Leberzellen verfettet, liegt nach THEUER eine Fettleber vor. Nach BERG (1967) liegt der Fettgehalt einer normalen Leber bei 5% des Feuchtgewichtes und der einer Fettleber bei mehr als 10% des Feuchtgewichtes. RÖWE und TRESEK (1962) betrachten einen Fettgehalt von 10-12% des Trockengewichts als Schwellenwert.

Histologisch unterscheidet man nach CAIN (1967) eine feintropfige, eine mittelgroßtropfige und eine großtropfige Form der Leberverfettung. Bei feintropfiger Fettablagerung überschreiten die einzelnen Tröpfchen kaum die Größenordnung des

Nucleolus, bei der mittelgroßtropfigen Form können die Fettsubstanzen so groß wie die Leberzellkerne werden, die großtropfige Fettablagerung nimmt fast den ganzen Cytoplasma-leib ein und verdrängt den Zellkern an den Zellrand.

Auf das ganze Leberläppchen bezogen differenziert man in zentrale, periphere (periportale) und diffuse Verfettungen. ZOLLINGER (1968) unterteilt die Leberverfettung wie in Abbildung 4 gezeigt wird.

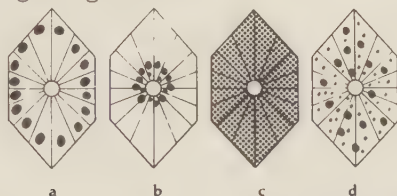


Abb. 4: Leberverfettung: a = nutritiv-periphero-azinäre, b = hypoxämisch-zentroazinäre, c = toxisch-panlobuläre → gemischt-tropfig-panlobuläre (d)

Da die Zellen der Läppchenperipherie zuerst mit dem arteriellen und portalen Blut in Berührung kommen, zeigen diese auch als erste Verfettungserscheinungen.

MEIER-RUGE et al. (1962) unterscheiden ätiologisch zwei Grundformen der Leberverfettung:

1. azinoperiphere und diffuse Verfettung
2. azinozentrale Verfettung

Die azinoperiphere und diffuse Verfettung ist verbunden mit einem größeren Defizit an Phosphatiden und Cholesterol.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über ultrastrukturelle Veränderungen bei Fettleber erlauben tiefere Einblicke in den gestörten Zellstoffwechsel und eine bessere Abstimmung morphologischer Befunde mit Ergebnissen der Biochemie. Jede histologisch "normale" Leberzelle enthält im Grundplasma elektronenmikroskopisch sichtbare kleine Fett-Tropfen. Untersuchungen verschiedener Stadien der Fettleber haben ergeben, daß sich zuerst innerhalb des endoplasmatischen Reticulums vermehrt Triglyzeride anhäufen. Die zunächst kleinen Lipid-Körper bilden im weiteren Verlauf größere Tropfen, die dann auch unter dem Lichtmikroskop sichtbar sind. Da Triglyzeride aus freien Fettsäuren und Glyzerophosphat im endoplasmatischen Reticulum synthetisiert werden,

häufen sie sich zunächst an dieser Stelle der Zelle an, die nicht in der Lage ist, sie in Lipoproteine umzuwandeln (FARBER 1966). Die bei der Fettleber an den Organellen zu erhebenden Befunde sind gering und nicht konstant. Gelegentlich sind in Fettlebern kleine Neutralfett-Tropfen im Zellkern zu finden. Häufiger treten vesikuläre Transformationen des glatten endoplasmatischen Reticulums sowie eine große Polymorphie der Mitochondrien auf.

2.4 Entstehungsursachen der Fettleber

Nach CAIN (1967), BRÜHL (1965) und THALER (1966) können folgende Möglichkeiten für eine Verfettung verantwortlich sein:

1. Steigerung der Fettsynthese
2. Verminderter Fettsabbau
3. Vermehrter Fettantransport
4. Verminderter Fettabtransport

Von den zahlreichen Mechanismen, die für eine Leberverfettung bedeutend sein können, nennt LIEBER (1968) folgende vier:

1. Erhöhte periphere Fettmobilisation
2. Verminderte Freisetzung von Leberlipoprotein
3. Verminderte Lipidoxidation in der Leber
4. Erhöhte Leber-Lipogenese

Nach DAHME und WEISS (1968) entwickeln sich Verfettungen des Leberläppchenzentrums bei Hypoxien, besonders Hypoxämien und Anämien, bei chronischen Ernährungsstörungen sowie bei Vergiftungen, die den Sauerstoffverbrauch in der Läppchenperipherie in so hohem Maße steigern, daß das Läppchenzentrum unter Hypoxie leidet. Periphere Verfettungen sind dagegen meist unmittelbare Folgen einer hämatogen einwirkenden Noxe.

Alkoholabusus dürfte eine der am längsten bekannten Ursachen der Fettleber sein (ROKITANSKY 1839). Toxisch für die Leber und damit Ursache einer Verfettung sind neben Alkohol u.a. CCl_4 , Phosphor, Äthionin, Orotsäure und Puromycin. Weitere Ursachengruppen sind Diabetes mellitus, Überernährung, Unterernährung und Mangelernährung. Insbesondere der

Mangel an sogenannten "lipotropen Substanzen" wie Cholin, Inositol, Biotin sowie Methionin führt zur Fettleber. Für Kwashiorkor, eine Krankheit, die in früher Kindheit infolge inadäquater Proteinzufuhr auftritt, ist Fettleber charakteristisch. Neben Proteinmangel führen aber auch Aminosäure-Imbalancen zu vermehrter Lipideinlagerung in der Leber.

2.4.1 Toxische Leberschädigung

Bei einer Betrachtung der Fettleber als Folge einer toxischen Leberschädigung steht als Noxe der Äthylalkohol im Vordergrund. Bei der Oxydation des Äthanol in der Leber wird NAD zu NADH_2 reduziert. Zur Reoxydation von NADH_2 werden 75 - 100% des gesamten O_2 -Verbrauchs der Leber beansprucht. Die metabolische Kapazität der Leber wird damit bei größerer Zufuhr von Alkohol überfordert (BÖHLE 1969).

LIEBER und SCHMID (1961) konnten zeigen, daß die Leberzellen NADH_2 dadurch wieder verfügbar machen, daß Wasserstoff mit Acetyl-CoA zu Fettsäuren aufgebaut wird. Dies ist allerdings nicht die einzige Ursache, warum chronischer Alkoholismus Fettleber bedingt. Bei der alkoholbedingten Fettleber handelt es sich teils um eine toxische Einwirkung des Äthanol auf die Leberzelle, ihre Strukturen sowie ihren Proteinstoffwechsel, teils um eine indirekte metabolische Beeinflussung des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels. Viele Autoren vertreten die Ansicht, daß Alkohol nur im Zusammenhang mit Fehlernährung als Grund der Verfettung anzusehen ist. Dagegen sprechen Ergebnisse, die Fettleber bei gut ernährten Alkoholikern aufweisen. Nach BÖHLE (1969) sind unkomplizierte Steatosen dem Alkohol selbst zuzuschreiben, während die Entwicklung einer Zirrhose um so eher erwartet werden kann, je stärker der Proteinmangel in der Nahrung des Alkoholikers ist (LIEBER 1968).

Neben einer verstärkten NADH-Bildung wurde nachgewiesen, daß Äthanol die sympathischen Nervenendigungen im Fettgewebe stimuliert, wobei Noradrenalin die Fettgewebslipase aktiviert, die dann Fettsäuren in Freiheit setzt (BRODIE et al. 1963, SCHEIG 1970). Zur experimentellen Erzeugung einer Fettleber im Tierversuch benutzt man häufig die Verabreichung von Tetrachlorkohlenstoff. Neue Erkenntnisse über die

Pathogenese der Fettleber brachte die Entdeckung von RECK-NAGEL (1960), daß die durch CCl_4 erzeugte Fettleber auf einen Block im Transfer der Triglyzeride von der Leber ins Plasma zurückzuführen ist. Danach nimmt die Leber weiter freie Fettsäuren aus dem Blut auf und verestert sie zu Triglyzeriden, die aber nicht schnell genug ins Blut abgegeben werden können, um ein Gleichgewicht aufrecht zu erhalten.

Nach FARBER (1966) ist sowohl bei CCl_4 wie auch bei der Intoxikation mit Phosphor, Äthionin und Puromycin die Anreicherung von Triglyzeriden in der Leber von einer signifikanten Hemmung der Leberprotein-Synthese begleitet. Bei Äthionin ist die Störung des Proteinstoffwechsels eine Folge der starken Verminderung der ATP-Konzentration der Leber (FARBER 1966). Bei Puromycin dagegen können die Aminosäuren sich nicht in Form von Peptidketten verbinden (DARKEN 1964).

2.4.2 Stoffwechselkrankheiten und Ernährungsfaktoren außer Protein als Ursache der Fettleber

Die Kapazität der Leber, unveresterte Fettsäuren des Blutes wieder zu verestern und sie als Lipoproteide zu sezernieren, ist begrenzt. Daher entsteht eine Fettleber immer dann, wenn das Organ mit freien Fettsäuren überschwemmt wird. Die Mobilisierung und damit ein Überangebot unveresteter Fettsäuren aus den peripheren Depots kann verschiedene Ursachen haben (TARNOWSKY 1967):

1. eine Hypersekretion der Hormone Cortisol und Thyroxin, die die Katecholamin-bedingte Lipolyse des Speicherfetts potenzieren oder
2. ein absoluter oder relativer Insulinmangel mit seinen Folgen: verminderter Glukoseeinstrom in die Fettzellen, Verarmung an Glycerin-1-phosphat, Verminderung der Lipogenese.

Bei der diabetischen Fettleber verläuft die Fettsäureverbrennung nur bis zum Coenzym A-Acetat ungestört. Ein Mangel an Oxalacetat behindert seine weitere Verbrennung im Citronensäurecyclus. Damitsind erst 25% der Energie verbraucht, die in den Fettsäuren enthalten sind. Große Mengen an Fettsäuren müssen aus den Depots freigesetzt werden, um dennoch die be-

nötigte Energie bereitzustellen (THALER 1966).

Entstehung einer Fettleber bei Cholinmangel in der Kost ist schon seit langem bekannt. Cholin kann zwar im Organismus synthetisiert werden, jedoch hängt die Biosynthese von Bedingungen ab, die bei verschiedenen Diätformen nicht gegeben sind.

In der durch cholinarme Diät erzeugten Fettleber ist der Gehalt an Cholinoydase regelmäßig stark vermindert. Man findet eine erheblich herabgesetzte Bildung von Plasmaphospholipiden. Das Ausmaß der Leberverfettung ist weniger abhängig von der Höhe der Fettzufuhr mit der Nahrung. Dagegen übt die Art des Nahrungsfetts einen großen Einfluß aus. Gesättigte Fettsäuren sind stärker wirksam als Polyensäuren, so daß die Fettablagerungen mit zunehmender Ungesättigtheit der Nahrungsfette immer geringer werden (IWAMOTO et al. 1963). Auf Grund von Versuchen mit Injektion von C^{14} -Palmitat an Ratten sehen LOMBARDI et al. (1968) die Ursache für eine Cholinmangel-Fettleber in der Beeinträchtigung der Freisetzung von Lebertriglyzeriden ins Plasma. Die Lipoperoxidation spielt keine Rolle bei der Entwicklung einer Fettleber nach Cholinmangel (GHOSHAL et al. 1970).

Großes Interesse hat in letzter Zeit die Orotsäure als Nahrungsbestandteil im Zusammenhang mit der Fettleber beansprucht. Orotsäure gehört als Precursor der Pyrimidine zu den Bausteinen der Nukleinsäuren. Eine Verfütterung von 0,2 - 1% Orotsäure im Futter bewirkt bei wachsenden und erwachsenen Ratten eine starke Leberverfettung, die schon nach einer Woche deutlich ist. Die Fettablagerungen sind hauptsächlich periportal lokalisiert.

Durch Zugabe von 0,25% Adeninsulfat wird eine Leberverfettung wieder rückgängig gemacht (HANDSCHUHMACHER et al. 1960). Offenbar verliert die Leber durch Verfütterung von Orotsäure die Fähigkeit, Lipide in das Apoprotein bei der Bildung von Lipoproteiden einzubauen (ROHEIM 1966). Nach WINDMÜLLER (1964) ist die Ursache der Leberverfettung durch Orotsäure in einem Defekt bei der Synthese oder der Sekretion von Lipoproteiden niedriger Dichte durch die Leber zu sehen.

2.4.3 Proteinmangel als Ursache der Fettleber

Das Schulbeispiel einer Proteinmangelkrankheit mit der Begleiterscheinung der Fettleber ist "Kwashiorkor". Diese Krankheit tritt häufig bei Kleinkindern in unterentwickelten Gebieten auf, die eine Proteinzufuhr weit unterhalb des Bedarfs oder ein Protein mit mangelhafter biologischer Wertigkeit erhalten. Dem Protein kann demzufolge eine lipotrope Wirkung zugeschrieben werden, die proportional der Proteinmenge in der Kost ist. Die Fettleber bei Kwashiorkor wird mit einer eiweißreichen, fettarmen Kost behandelt.

Die ersten Versuche, die auf eine lipotrope Wirkung von Protein hinweisen, wurden von BEST und HUNTSMAN (1932, 1935) durchgeführt. Die Autoren vermuteten zunächst, daß diese Wirkung auf Verunreinigungen, insbesondere Betsine im Casein, dem Protein des Versuchsfutters, zurückzuführen sei. Es zeigte sich jedoch, daß die lipotrope Wirkung proportional dem Gehalt des Futters an Protein war (CHANON und WILKINSON 1935).

Über den biochemischen Mechanismus, der zu einer Fettleber bei Proteinmangel führt, ist bisher wenig bekannt, sofern nicht eine Aminosäure-Imbalanz angenommen werden muß (siehe 2.4.4). Als pathogenetische Faktoren für Fettleber bei Proteinmangel werden erhöhte Leber-Triglyzerid-Synthese aus Kohlenhydraten, erhöhte Freisetzung von Fettsäuren aus den Depots und Beeinträchtigung der Sekretion von Triglyzeriden aus der Leber angenommen (MACDONALD et al. 1963, LEWIS et al. 1964, FLETCHER 1966).

PORTA et al. (1970) schließen aus dem erhöhten Triglyzeridgehalt der Leber und dem erniedrigten des Serums sowie dem niedrigen Plasmalipoproteinspiegel auf eine Beeinträchtigung der Triglyzeridsekretion, wobei andere Einflüsse nicht auszuschließen sind. Diese Ansicht stimmt weitgehend mit den von FLORES et al. (1970) gefundenen Ergebnissen überein, die kurzfristig proteinfrei ernährten Ratten das Apoprotein niedermolekularer Lipoproteide injizierten, das aus dem Serum gesunder Ratten isoliert worden war. Hierdurch stieg der Plasmatriglyzeridspegel

bis zu 80% an. Die gleichzeitige Injektion von ^{131}J -Ölsäure führte zu einem vermehrten Einbau der Fettsäure in die Plasmatriglyzeride. Daraus erklären die Autoren die Entstehung einer Fettleber bei Proteinmangel so, daß Triglyzeride zum Transport aus der Leber ins Blut an ein niedermolekulares Protein gebunden werden müssen. Eine solche Verbindung steht bei Proteinmangel nicht oder nicht in ausreichendem Maß zur Verfügung.

In Untersuchungen über die Wirkung von proteinarmer Kost auf die Zellfraktionen der Ratte fanden HARADA und MOGI (1966) eine Erhöhung des Quotienten Gesamtlipide : N der Mitochondrien. Weitere Versuche, in denen die Fettsäurezusammensetzung der Phosphatide in den Mitochondrien der Rattenleber untersucht wurden, ergaben bei proteinarmer Kost eine signifikante Erhöhung der Dokosapentaensäure- und Stearinsäure-Gehalte auf Kosten der Arachidonsäure. Die physiologischen und biochemischen Funktionen der Dokosapentaensäure in der Leber sind den Autoren noch unbekannt (HARADA et al. 1969).

2.4.4 Einfluß von Aminosäure-Imbalanzen auf die Lipideinlagerung in der Leber

Bereits frühere Versuche, die von der Annahme ausgingen, daß Casein eine stärkere lipotrope Wirkung ausübt als Cholin, hatten zu gezielten Studien über die Wirkung einzelner Aminosäuren geführt. Die Frage, ob der Mangel an bestimmten essentiellen Aminosäuren eine Verfettung der Leber hervorruft, lag nahe. Ohne Zweifel kann man unter bestimmten Bedingungen das Symptom der Fettleber erzeugen, das auf Threonin-, Lysin- oder Tryptophanmangel zurückzuführen ist (SINGAL et al. 1953, HARPER et al. 1953, COLE et al. 1954). Es ist außerdem wahrscheinlich, daß Mangel an anderen Aminosäuren (Methionin, Glycin, Serin, Leucin, Phenylalanin) ähnliche Wirkungen zeigten (SAUBERLICH 1953, WINJE et al. 1954, DESHPANDE et al. 1958).

Nicht nur der Mangel, sondern auch die Vermehrung der Zufuhr an bestimmten Aminosäuren kann jedoch bei einem Proteingehalt der Kost an der Grenze des Bedarfs zu einer

Leberverfettung führen. Der Proteinstoffwechsel wird intensiviert, der Umsatz auf ein höheres Niveau gehoben. Das Wachstum hat unter diesen Umständen die größere Dringlichkeitsstufe und verbraucht soviel von der nun limitierenden Aminosäure, daß für andere Zwecke nur noch begrenzte Mengen zur Verfügung stehen.

SAUBERLICH (1961) berichtete zum Beispiel über die Erzeugung von Aminosäure-Imbalancen mit allen Aminosäuren, mit Ausnahme von Alanin. Am wirksamsten war Methionin. Es folgten - mit abnehmender Wirkung - Tryptophan, Histidin, Tyrosin, Phenylalanin, Cystin, Leucin, Valin, Isoleucin, Glycin, Arginin, Asparagin, Lysin und Threonin. Nur wenig wirksam waren Glutamin, Prolin und Serin. Das Ausmaß der Imbalanz war stark abhängig von der Art des verfütterten Proteins. Ein Zusatz von Cystin (5%) führte bei Casein zu einer Imbalanz, nicht dagegen bei Lactalbumin.

Damit trat die Frage nach dem Gleichgewicht der Aminosäuren in der Nahrung bzw. nach der Aminosäure-Imbalanz als Ursache bei der Entstehung einer alimentären Fettleber immer mehr in den Vordergrund. Ein Protein, das Aminosäuren in dem Verhältnis enthält, wie sie vom Körper benötigt werden, wird als "balanced" Protein bezeichnet. Die Bezeichnung "Aminosäure-Imbalanz" ist aus Versuchen hervorgegangen, in denen Proteinmangelsymptome, Stoffwechselentgleisungen oder Funktionsstörungen anderer Art ("adverse effects") beobachtet wurden, sobald die Aminosäurezusammensetzung des Proteins einer Kost, gewöhnlich einer proteinarmen Kost, durch Zugabe einer essentiellen Aminosäure aus dem Gleichgewicht gebracht wurde. Die verminderte Futteraufnahme und damit vermindertes Wachstum, sowie die Erhöhung der Leberlipide, gehen einher mit verminderter N-Ausnutzung sowie erhöhtem Bedarf der am stärksten limitierenden Aminosäure (HARPER 1959). Jedoch nicht jedes proteinarme Futter erzeugt Fettleber. Ebenso können die Fettwerte normal sein, wenn bei einer Kost mit hohem Proteingehalt eine Aminosäure fehlt. HARPER (1958) schloß daraus, daß sowohl Aminosäure-Imbalancen als auch Gesamt-N-Gehalt des Futters die Lipideinlagerung in der

Leber beeinflussen. Tatsächlich hat man festgestellt, daß auch bestimmte, nichtessentielle Aminosäuren in hohen Dosen (1,5% Glycin, 1,5% Serin, 2,7% Asparaginsäure, 3,0% Glutaminsäure, 1,5% Ammoniumacetat) den Leberfettgehalt bei proteinärmer Kost reduzieren (HARPER et al. 1954a, BENTON et al. 1955).

HARPER und ROGERS (1965) sahen in der verringerten Futteraufnahme ein Leitsymptom für die Aminosäure-Imbalanz und suchten nach einer Erklärung hierfür. Sie gingen davon aus, daß das Nahrungsprotein normal verdaut und die Aminosäuren quantitativ resorbiert werden. Dies führt zu einer Erhöhung aller essentiellen Aminosäuren im Pfortaderblut, das zur Leber fließt. Die Erhöhung der Aminosäurezufuhr steigert die Synthese und vermindert den Abbau von Protein. Dabei wird eine größere Menge der limitierenden Aminosäure in der Leber der Imbalanz-Gruppe retiniert als in der Kontrollgruppe. Die Menge der limitierenden Aminosäure für das Gewebe wird entsprechend vermindert. Das Ergebnis kann sein, daß die freien Aminosäuren sowohl im Muskel als auch im Plasma eine starke Imbalanz aufweisen entsprechend der Kombination, die einer schweren Mangelkost folgt. Diese Imbalanz hat offenbar eine Rückwirkung auf das Appetit-Regulationszentrum im ZNS und als Folge wird die Futteraufnahme eingeschränkt. Dadurch wird die Energie- und Aminosäurezufuhr verringert.

Eine Bestätigung dieser Hypothese ist nach Ansicht der Autoren in einem erhöhten Gehalt an essentiellen Aminosäuren in den Intestinalgeweben und in der Leber bei Tieren mit Imbalanzfutter zu sehen. Weiterhin trat bei gleichbleibender Futteraufnahme auch bei Aminosäure-Imbalanz keine Wachstumsverzögerung auf. Dies wurde mit verschiedenen Methoden überprüft: durch Insulin-Injektion, um die Futteraufnahme zu stimulieren (KUMTA und HARPER 1962), durch Angleichung des Protein-Kalorienverhältnisses im Futter (FISHER und SHAPIRO 1961), durch Kältestress (KLAIN et al. 1962, KLAIN und VAUGHN 1963), durch Cortisol-Injektion (LEUNG et al. 1964) und durch "forced-feeding" (LEUNG et al. 1964). Alle Versuche ergaben ein verbessertes Wachstum.

In einer neueren Mitteilung wurde von PENG und HARPER (1970) auf die unterschiedliche Bedeutung der Zugabe essentieller und nicht-essentieller Aminosäuren hingewiesen. Sie zeigten, daß Zulagen essentieller Aminosäuren zur Kontrollkost den Plasma-Aminosäurespiegel stärker erhöhen als Zugaben nicht-essentieller Aminosäuren, obwohl beide Gruppen gleiche Stickstoffzufuhr erhielten. Dies stimmt mit Ergebnissen über die Aktivität kataboler Enzyme der essentiellen Aminosäuren überein, deren Aktivität geringer ist als die der nicht-essentiellen Aminosäuren. Die metabolische Kapazität von Ratten wird mit hohen Zulagen an essentiellen Aminosäuren stärker belastet oder überlastet als mit Zulagen entbehrlicher Aminosäuren. Eine Aminosäure-Imbalanz mit der charakteristischen Folgeerscheinung der Fettleber entsteht somit schneller und leichter bei der Zulage essentieller Aminosäuren.

2.4.4.1 Methionin und Cystin

Ältere Studien in Bezug auf die Wirkung einzelner Aminosäuren zeigten, daß Cystin eine antilipotrope Wirkung aufweist, die durch zusätzliche Caseingaben reversibel ist (BEESTON et al. 1936a, 1936b). Auch KLAVINS (1963) stellte bei einer synthetischen Kost, die 6% L-Cystin enthielt, bei Ratten Leberschädigungen mit periportal Fibrosis fest. Weitere Aminosäuren wiesen keine lipotrope Wirkung auf, jedoch fand man, daß Methionin bei Cholinmangel Fettleber verhinderte (TUCKER et al. 1937, CHANNON et al. 1938, BEESTON et al. 1940, SINGAL et al. 1939). Das Verhältnis von Cystin : Methionin wurde als wesentlich für die lipotrope Wirkung eines Proteins bei Cholinmangel am Rattenversuch angesehen (CHANNON et al. 1938, TUCKER und ECKSTEIN 1938).

Neue Ergebnisse weisen darauf hin, daß bei ausreichender Cholinzufuhr weniger das Verhältnis Cystin : Methionin bei der Lipideinlagerung in der Leber eine Rolle spielt als der Gesamtgehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren in der Nahrung (AOYAMA et al. 1969).

Auch frühere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, daß die lipotrope Wirkung von Casein auf dem Gehalt an Methio-

nin und Cystin im Futter beruht (TUCKER et al. 1940, TREADWELL et al. 1942, HORNING und ECKSTEIN 1944, TREADWELL et al. 1944). Dabei zeigte sich, daß Methionin als lipotroper Stoff bei ausgewachsenen Ratten wirkungsvoller ist als bei wachsenden. Ferner war es weniger effektiv bei hohen als bei niedrigen Proteinsgaben (TREADWELL et al. 1942, HORNING und ECKSTEIN 1944). Das weist darauf hin, daß bei erhöhtem Bedarf von Aminosäuren für die Proteinsynthese die lipotrope Wirkung von Methionin vermindert ist. Bei inadäquater Kost jedoch zeigt es dennoch eine lipotrope Wirkung, da relativ wenig Methionin für das Wachstum benötigt wird. Die Ursache für die lipotrope Wirkung des Methionins dürfte auf seine Rolle als Methylgruppendonator für Cholinvorstufen zurückzuführen sein (DU VIGNEAUD et al. 1940).

Der Zusammenhang von Cholin und Methionin in Verbindung mit der Phospholipidsynthese wurde in neuerer Zeit von HAGGARD und PARKS (1970) untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß der Einbau von Cholin in Leberphospholipide vom Cholingehalt des Futters, nicht aber von seinem Methioningehalt abhängig ist. Cholin-1,2-¹⁴C wurde nämlich in gleichem Maß eingebaut, unabhängig davon, ob Methionin im Futter war oder nicht. Daraus wurde geschlossen, daß der Einbau von Cholin in Phosphatidylcholin unabhängig von der Reihenfolge der Methylation ist und zwei getrennte Pools für Phosphatide bestehen.

Bei ausreichendem Cholingehalt der Kost und einer Proteinzufuhr an der Grenze des Bedarfs (8-9% Casein) kann eine Zulage von Methionin (0,3%) auch zu einer vermehrten Fetteinlagerung in der Leber führen. Dieser "antilipotrope" Effekt ist nach Ansicht von HARPER et al. (1954) darauf zurückzuführen, daß die S-haltigen Aminosäuren primär begrenzend sind, eine Zulage von Methionin aber den sekundären Mangel von Threonin und Tryptophan zur Auswirkung bringt, zumal Threonin-Zulagen (0,36%) die Fetteinlagerungen verringern (SINGAL et al. 1953, HARPER et al. 1953). Aus Versuchen von AOYAMA et al. (1969) geht ebenfalls hervor, daß die Höhe der schwefelhaltigen Aminosäuren im Futter als wesentlicher Faktor anzusehen ist, der die An-

reicherung von Leberlipiden bei Ratten mit proteinarmer Kost bestimmt. Die Analyse des Leberfettes zeigt, daß der Anstieg der Lipide in erster Linie auf einer erhöhten Triglycerideinlagerung beruht (OGURA et al. 1968).

Verschiedentlich wurde die Beziehung von Methionin zu bestimmten Aminosäure-abbauenden Enzymen in der Leber untersucht. OGURA (1966) stellte bei Enzymaktivitätsbestimmungen von Serin-Dehydrase, Homoserin-Dehydrase und Threoninaldolase, Enzyme, die am Stoffwechsel von Methionin und Threonin beteiligt sind, keine Beziehung zur Fetteinlagerung in der Leber fest. SANCHEZ (1969) ermittelte nach einer Zulage von 4% Methionin zu einer Aminosäuremischung, die 20% Protein entsprach, eine erhöhte Aktivität aller Enzyme außer Glutamat-Oxalacetat-Transaminase. Die Aktivität der Threonin-Dehydrase war direkt abhängig vom Methioninspiegel in Plasma und Leber. Diese Ergebnisse werden durch NAKANO et al. (1970) bestätigt. Diese Autoren untersuchten ferner die Wirkung von Cortisonacetat, wodurch sowohl die Aktivität der Leber-Tryptophan-Pyrrolase, der Threonin-Dehydratase als auch der Arginase erhöht wurde. Auf Grund dieser Ergebnisse wird postuliert, daß der Gehalt an Aminosäure-abbauenden Enzymen in der Rattenleber durch zwei getrennte Mechanismen, hormonell sowie hormonunabhängig, erhöht werden kann.

Weitere Versuche im Zusammenhang mit hormonellen Einflüssen und Fettleber wurden in jüngerer Zeit durchgeführt. Injektion von Thyroxin verminderte hierbei die Fettleber infolge proteinarmer Kost mit Zulage schwefelhaltiger Aminosäuren (YOSHIDA und HARPER 1969). Adrenalektomie verhinderte ebenfalls die Entstehung einer Fettleber, während eine Injektion von Cortisol bei adrenalektomierten Ratten den Fettgehalt erhöhte. Auch auf Lipideinlagerungen bei Methioninmangel scheinen hormonelle Einwirkungen Einfluß zu haben. So schützt Testosteron-Anwendung kastrierte männliche und weibliche Ratten vor Fettleber, während nichtbehandelte Ratten Fettleber entwickeln (SIDRANSKY et al. 1967). Versuche von LYMAN et al. (1964a) deuten dies ebenfalls an. Nur weibliche Tiere entwickelten Fettleber bei Methionin-Mangelkost, nicht dagegen männliche.

2.4.4.2 Threonin

Die Beobachtung, daß bei proteinarmer Kost, die Cholin und Methionin enthielt, Fettleber auftrat, führte zu der Überlegung, daß auch andere Aminosäuren die Lipideinlagerung in der Leber beeinflussen und der Methionin-Effekt nicht allein auf einer Cholin-sparenden Wirkung beruht (HAWK et al. 1953, LITWACK et al. 1952). Es konnte gezeigt werden, daß ein partieller Mangel an Threonin oder Lysin ebenfalls bei adäquater Cholinzufuhr eine Erhöhung der Leberlipide hervorrief (SINGAL et al. 1953, HARPER et al. 1953, DESHPANDE et al. 1958).

Die Ursachen, die zu einer Fettinfiltration infolge Threoninmangels führen, sind weitgehend ungeklärt. Theoretisch kann jede metabolische Funktion wie Fettsynthese, Fettoxydation oder Fett-Transport beeinflußt sein, denn sowohl die Synthese von Proteinen einschließlich der Enzyme, Hormone als auch die der Lipoproteide ist von einer adäquaten Aminosäurezufuhr abhängig.

In Versuchen mit C^{14} -Acetat und Palmitat wurde von YOSHIDA und HARPER (1960) bei Threonin-Mangeltieren ein Leberfettgehalt von 21,8% und in der Gruppe mit Threoninzusatz ein Leberlipidgehalt von 9,9% festgestellt. Lediglich der Neutralfettgehalt, nicht der Phospholipidgehalt der Leber, war beeinträchtigt. Ein Beweis für die verminderte Oxydation von Palmitat oder Acetat durch Threoninmangel konnte nicht erbracht werden. Die Möglichkeit einer verringerten Fettoxydation wird von den Autoren jedoch nicht ausgeschlossen. Eine erhöhte Akkumulation von Körperfett in der Leber wird ausgeschlossen, da die spezifische Aktivität der Leberneutralfette die des Körperfettes nach Injektion von markiertem Acetat und Palmitat überschritt. Die Verfasser nahmen eine erhöhte Fettsynthese in der Leber, nicht im Körper, sowie einen verminderten Fettabtransport aus der Leber an.

Ebenfalls eine Erhöhung der Gesamtlipide und Triglyzeride in der Leber von Threonin-Mangel-Ratten stellten WILFRET und SEKHARA VARMA (1969) fest, wobei gleichzeitig die Serumtriglyzeride unverändert blieben. Aus ihren Versuchen, gleichfalls mit C^{14} -Acetat, schließen die Autoren,

daß die Fettleber bei Threoninmangel auf eine erhöhte hepatische Lipidsynthese zurückzuführen ist, wie auch bei Fettleber nach Isoleucinmangel (LYMAN et al. 1964b) oder bei proteinarmer Kost mit partiellem Threoninmangel (YOSHIDA und HARPER 1960). Allerdings ist der Mechanismus, der die Fettsynthese stimuliert, noch ungeklärt. Auf Grund der von Mangeltieren isolierten Mitochondrien, die Octanoat normal oxydierten, nehmen WILFRED und SEKHARA VARMA (1969) im Gegensatz zu YOSHIDA und HARPER (1960), die diese nicht völlig ausschließen, eine verminderte Fettsäureoxydation als Ursache der Verfettung nicht an.

Die Wirkung von Threoninmangel und Kalorienausnutzung in Bezug auf die Lipidsakkumulation in der Leber untersuchten YOSHIDA und ASHIDA (1962). Dabei wurde festgestellt, daß der Leberfettgehalt der Mangelratten mit der Verminderung der Kalorienzufuhr sank. Damit wurden die Ergebnisse von YOSHIDA et al. (1961) bestätigt, die durch leichte Kalorienrestriktion den Leberfettgehalt bei Threoninmangel senken konnten.

Auf eine spezifische Wirkung von Threonin, insbesondere im Zusammenhang mit anderen Aminosäuren und hier vor allem Lysin, schließen OGURA und NAKAMURA (1963) bei der "lipötrophen" Wirkung nach Zulage dieser Aminosäure. Bestätigt werden diese Vermutungen durch spätere Versuche, in denen gezeigt werden konnte, daß ein niedriger Lysingehalt in der Kost den Threoningehalt in Blut und Urin erhöht und die Fähigkeit der Leber, Threonin abzubauen, vermindert. Erhöhung des Lysingehaltes verringerte Blut- und Urinspiegel von Threonin und verbesserte den Threoninabbau durch die Leber. Dieser Effekt war auf eine erhöhte Threonin-Dehydratase-Aktivität bei vermehrter Lysingabe zurückzuführen, gemessen an der gebildeten L-Ketobuttersäuremenge (YAMASHITA et al. 1967).

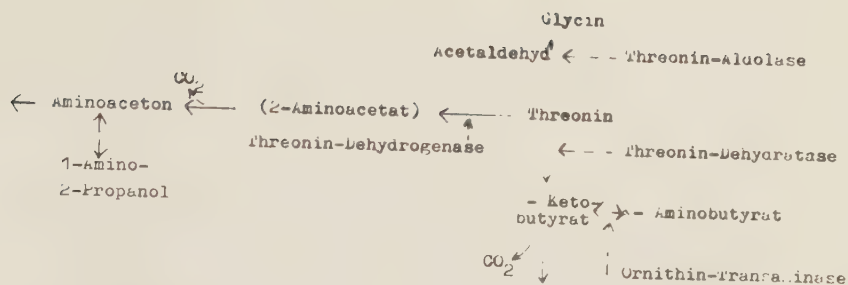


Abb. 5: Abbauewege von Threonin (nach YAMASHITA et al. 1967)

Biochemische Untersuchungen zur "Threoninmangel-Fettleber", in denen die Pyridin-Nukleotid-Konzentration der Leber untersucht wurde, gaben keinen Hinweis auf Beziehungen zwischen Fettleber und Änderungen der Pyridin-Nukleotid-Konzentration in der Leber. Auf Wechselwirkungen zwischen dem Auftreten einer Fettleber und der Aktivität von Enzymen des Aminosäuremetabolismus, insbesondere auf die Threonin-Aldolase-Aktivität, wurde im vorhergehenden Abschnitt verwiesen.

2.4.4.3 Lysin, Tryptophan, Arginin, Histidin

Von SINGAL et al. (1953) wurde gezeigt, daß ein partieller Mangel an Lysin bei adäquater Cholinzufuhr ebenfalls zu Fetteinlagerungen in der Leber führt. Dieselbe Beobachtung machten VIVIANI und SECHI (1963) bei einer Mangelkostform mit Lysin als erste begrenzende und Threonin als zweite begrenzende Aminosäure. Sie beobachteten ferner eine Zunahme des Gesamtleber-Cholesterins, während der Gehalt des Plasmas an Cholesterin niedrig war. Die Autoren vermuten eine Herabsetzung des Cholesterintransports aus der Leber infolge einer Störung der Biosynthese und des Katabolismus des Cholesterins, bewirkt durch den niedrigen Proteingehalt des Serums. Weitere Versuche von VIVIANI et al. (1966) zeigten eine Vermehrung der Palmitinsäure in den Phosphatiden der Lysin- und Threonin-Mangeltiere. Der Einbau von ^{14}C -Acetat in

Phosphatide war bei Mangeltieren geringer, jedoch nicht der Einbau in andere Lipide. Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, daß der Lysin- und Threoninmangel multiple Stoffwechselstörungen verursacht, jedoch können keine Schlüsse auf ursächliche Zusammenhänge mit der Entwicklung der Fettleber gezogen werden.

Das Auftreten einer peripheren Leberverfettung durch Injektion von L-Tryptophan führte HIRATA et al. (1967) zu der Vermutung, daß eine Verminderung des ATP-Spiegels die Proteinsynthese herabsetzt und dadurch die Leber nicht mehr Triglyzeride als Lipoproteide ins Plasma abgeben kann.

Arginin ist für die Ratte eine halbessentielle Aminosäure. Junge Ratten sind auf die Zufuhr von Arginin angewiesen (BORMAN et al. 1946). ROSE (1937) gibt bei 20% Protein im Futter den Bedarf der Ratte mit 0,20% an. Argininzulagen bewirken eine erhebliche Verbesserung des Wachstums. Die Verfütterung von mit Aminosäuren angereicherten Proteinen setzt bei Ratten für eine optimale Gewichtszunahme eine bestimmte Argininzufuhr (0,8%) im Futter voraus (HEPBURN und BRADLEY 1964). Im Intermediärstoffwechsel ist Arginin, außer an der Eiweißsynthese, auch an der Biosynthese des Kreatins sowie an der Harnstoffsynthese beteiligt.

Über die besondere "entgiftende" Wirkung von L-Arginin wird in den Arbeiten von GREENSTEIN et al. (1955a), GULLINO et al. 1955b, RUISEAU et al. 1956) berichtet. Danach wurde die Toxizität relativ hoher Dosen einzelner Aminosäuren oder Aminosäuremischungen durch L-Argininzugabe verringert. Es wird vermutet, daß die Wirkung des Arginin in Beziehung zu der erhöhten Aktivität im Harnstoffzyklus steht.

Bei Verfütterung einer Aminosäuremischung, die Vollei entsprach und einen Zusatz nichtessentiellen Stickstoffs in Form von Alanin, Serin, Prolin Asparagin und Glutamin sowie zusätzlich Arginin und Histidin enthielt, blieb der Serum-Transaminase-Spiegel normal, während er ohne Zusatz von Arginin oder Histidin anstieg. Ob dies eine

Wirkung von Arginin oder Histidin ist, kann nach Angabe der Autoren noch nicht differenziert werden (GLYNN et al. 1970). Zu gleichen Ergebnissen in Versuchen an Menschen kamen KOFRÁNYI et al. (1969).

3. Untersuchungsmaterial und Methoden

3.1 Herstellung von Modellmischungen für die MAILLARD-Reaktion

500 g Casein wurden mit 500 g Glukose unter Zusatz von 750 ml dest. Wasser gründlich vermischt und anschließend im vorgeheizten Trockenschrank auf 140°C erhitzt. Die Erhitzungsdauer betrug für die Versuchsreihen I und II 60 min, für III 120 min, für IV und V 90 min. Das Bräunungsprodukt wurde grob zerkleinert, 14 Tage bei Zimmertemperatur getrocknet und bis zur Korngröße des Caseins gemahlen. Zusätzlich wurde ein überhitztes, tiefbraun gefärbtes Produkt durch Ausdehnung der Erhitzungsdauer auf 5 Std. hergestellt.

3.2 Tiermaterial und Tierhaltung

Insgesamt wurden 5 Versuchsreihen durchgeführt, wobei Futter und Wasser ad libitum verabreicht wurden. Die Versuche wurden an wachsenden männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover bezogen.

Die Haltung der Tiere erfolgte einzeln in Drahtkäfigen. Für jede Versuchsreihe wurden die Ratten in Gruppen von 10 bzw. 12 Tieren eingeteilt. Die Temperatur der Räume, in denen die Tiere gehalten wurden, betrug 22° - 24°C bei konstanter Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60%. Die Versuchsdauer betrug jeweils 4 Wochen. In einer dreitägigen Vorperiode der Futterumstellung erhielten die Tiere Al-tromin. Die Tiere wurden in allen Versuchen zweimal wöchentlich gewogen. Der Futterverbrauch wurde wöchentlich bestimmt. Die Futternäpfe waren mit einem Drahtnetz be-

deckt, um ein Verstreuen des Futters zu verhindern.

Am Ende jedes Versuches wurden die Ratten getötet, das Blut durch Herzpunktion gewonnen und die Leber entfernt. Des Frischgewicht der Leber wurde sofort ermittelt. Für die histologische Untersuchung wurden Leberproben in 4%iger Formaldehydlösung aufbewahrt.

3.3 Futtermischungen

Tabelle 2: Zusammensetzung von "Altromin-R" (Futter der Vorperiode)

<u>Gementeile</u>	<u>%</u>
Gerste	45
Hafer, geschrot.	18
Mais, geschrot.	10
Fischmehl	6
Fleischfuttermehl	6
Bierhefe, getrockn.	5
Luzernegrünmehl	4
Weizenkeime, zerkl. ...	3
Futterknochenschrot (angereichert mit Vita- minen u. Mineralstoffen) 1 einged.Fischpreßsäfte ...	1
"Fevex"phosph.Futterkalk	1
	100

Tabelle 3: Grundfutter der Versuchsreihen I - V

	Menge/kg
Glukose	460 g
Erdnußöl	60 g
Vitamin A	10 000 I.E.
Vitamin D ₃	1 300 I.E.
Vitamin E	100 mg
Vitamin B ₁₂	30 mcg
Mineralstoffmischung	50 g
Vitaminmischung	10 g
Reisstärke (mit 15% CholinCl)	10 g

Tabelle 4: Vitaminmischung

	Menge/kg Futter
Menadion (Na-bisulfit)	5,0 mg
Thiamin-HCl	10,0 mg
Riboflavin	10,0 mg
Ca-Panthothenat	50,0 mg
Niacin	50,0 mg
Pyridoxin-HCl	10,0 mg
Folsäure	2,0 mg
Biotin	0,4 mg
Inosit	100,0 mg
Ascorbinsäure	50,0 mg
Reisstärke	ad 10,0 g

Tabelle 5: Mineralstoffmischung

	Menge/kg Futter
CaCO_3	15,0 g
KH_2PO_4	17,3 g
NaCl	12,2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5,0 g
Fe-Citrat	0,31 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	91 mg
ZnO	25 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	31,3 mg
NaF	0,22 mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_4\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,18 mg
Na_2SeO_3	22 mcg
KJ	0,26 mg

Die Zusammensetzung der Vitamin- und Mineralstoffmischung erfolgte nach F.H. KRATZER (persönl. Mitteilung).

Proteinanteil: Casein, vitaminfrei, der Fa. Nutritional Biochemicals.

N-Gehalt: 15,08% ($\times 6,25 = 94,25\%$ Protein)

Zur Anreicherung verwendete Aminosäuren:

L-Arginin-monohydrochlorid	der Fa. Serva
L-Histidin-monohydrochlorid	der Fa. Schuchardt
L-Lysin-monohydrochlorid	der Fa. Schuchardt
D,L-Methionin (DL-2-Amino-4-(methylthio)-Buttersäure)	der Fa. Schuchardt
L-Methionin (L-2-Amino-4-(methylthio)-Buttersäure)	der Fa. Schuchardt
L-Threonin (1-2-Amino-3-Hydroxybuttersäure)	der Fa. Schuchardt
L-Tryptophan	der Fa. Schuchardt

Zur Herstellung der Futtermischungen wurden die Bestandteile des Grundfutters zunächst 30 min in der Mischmaschine vorgemischt. Anschließend wurden alle Futterbestandteile für jede Versuchsgruppe (Grundfutter, Casein, Maillardprodukte und zur Anreicherung vorgesehene Aminosäuren) zusammengegeben und wiederum 30 min in der Mischmaschine vermischt. Das Futter wurde für jeweils eine Versuchsperiode vorbereitet und bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Tabelle 6: Futterzusammensetzung der Versuchsreihen I - V (g in 100 g Futter)

Ver- suchs- reihe	Grund- futter	Casein	Glukose	Gas.+ er- hitzt	Met	Lys	Try	Thr	Arg	His	Gas. + Gluk. erhitzt 5 Std.
I	1	59,0	20,0	20,8	0,2*						
	2	59,0		0,8	40,0	0,2					
II	1	59,0	20,9	20,1							
	2	59,0		1,0	40,0						
	3	59,0		0,1	40,0	0,2	0,6	0,1			
III	1	59,0	20,0	21,0							
	2	59,0		4,0	37,0						
	3	59,0		3,1	37,0	0,2	0,6	0,1			
	4	59,0	20,0	16,0							5,0
IV	1	59,0	20,0	20,8	0,2						
	2	59,0		0,8	40,0	0,2					
	3	59,0			40,0	0,4	0,6	0,1			
	4	59,0		0,1	40,0	0,2	0,6	0,1			
	5	59,0			40,0	0,4	0,6	0,1	0,3		
V	1	59,0	20,0	21,0	0,2						
	2	59,0		1,0	40,0	0,2					
	3	59,0		1,0	40,0	0,4	0,6	0,1	0,3		
	4	59,0		1,0	40,0	0,4	0,6	0,1	0,3	0,3	
	5	59,0		1,0	40,0	0,2	1,2	0,1	--	0,5	0,1

* Casein + Glukose erhitzt: Versuchsreihen I und II : 60 min 140°C

Versuchsreihe III : 120 min 140°C

Versuchsreihen IV und V : 90 min 140°C

* D,L-Methionin

3.4 Chemische Untersuchungsmethoden

3.4.1 Stickstoffbestimmung

Die Stickstoffbestimmung in den MAILLARD-Produkten und im Futter erfolgte nach der Methode von KJELDAHL in einem modifizierten Verfahren nach PARNAS-WAGNER. Als Katalysator diente ein Selenreaktionsgemisch nach WIENINGER (Gemisch von Selendioxyd, Kupfersulfat und Kaliumsulfat).

Bis zu vier Stunden nach Klarwerden des Gemisches wurde die Veraschung fortgesetzt. Die Destillation des Ammoniaks erfolgte für die Dauer von 6 min in einer BÜCHI-Apparatur, wobei als Vorlage 2%ige Borsäure diente. Das entstandene Ammoniumborat wurde mit $\frac{n}{70}$ H_2SO_4 zurücktitriert (1 ml = 0,2 mg N) unter Verwendung eines Mischindikators nach KOLTHOFF.

3.4.2 Säurehydrolyse zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Proteinen

Die Säurehydrolyse wurde nach der Methode von DUSTIN et al. (1953), modifiziert nach MENDEN und CREMER (1966), in einem Verhältnis von 25 mg Protein zu 250 ml redestillierter 6 n HCl bei 120°C (Glycerinbad) am Rückflußkühler durchgeführt. Nach der Entfernung der Salzsäure mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei 60°C unter Vakuum, wurde das Hydrolysat mit Citratpuffer pH 2,20 quantitativ in ein 20 ml Meßkölbchen überführt. Davon wurden jeweils 0,5 ml (= 1,25 mg Protein) zur Aminosäurebestimmung mit Hilfe der Säulenchromatographie eingesetzt.

3.4.3 Alkalische Hydrolyse zur Tryptophanbestimmung in Proteinen

Die alkalische Hydrolyse wurde nur im Hinblick auf die folgende Tryptophanbestimmung durchgeführt. 500 mg Protein (= 80 mg Nx 6,25) wurden mit 50 ml 20%iger KOH 30 min bei 120°C (Glycerinbad) am Rückflußkühler hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit H_2O in ein 100 ml Meßkölbchen überführt. Davon wurden 10 ml in ein 25 ml Meßkölbchen pipetiert, mit Essigsäure neutralisiert und 2 ml zur Bestimmung verwendet (VANGALA und MENDEN 1970).

3.4.4 Enzymatische Hydrolyse zur Ermittlung der Verfügbarkeit von Aminosäuren

Nach der Methode von MENDEN und CREMER (1966) wurden 200 mg Protein für 15 Stunden bei 37°C in einem 20 ml Erlenmeyerkolben mit 100 mg Pankreatin (Merck) und 10 ml Puffer pH 8,2 inkubiert. Die Konzentration von Pankreatin im Verhältnis zum Protein erscheint extrem hoch. In vielen vorhergehenden Versuchen zeigte sich jedoch immer wieder, daß diese Kombination bei relativ kurzen Hydrolysezeiten für den angestrebten Zweck besonders günstig ist. Die Möglichkeit einer Autolyse des Pankreatins wurde in Blindversuchen getestet. Sie lag bei den gegebenen Versuchsbedingungen unter 1%.

Die Fällung des nichthydrolysierten, löslichen Proteins erfolgte durch Zugabe von 5 ml 10%iger Zinksulfatlösung und 5 ml 3%iger NaOH (Fällung mit $Zn(OH)_2$). Nach 10 min wurde abfiltriert. 5 ml des Filtrats wurden mit 1 ml 1%iger H_2SO_4 sowie 4 ml Citratpuffer pH 2,20 versetzt. Je 1 ml wurde zur Bestimmung mittels Säulenchromatographie verwandt.

Reagentien:

Borat-Phosphatpuffer: Lösung A: 19,10 g Borax in 1000 ml H_2O
Lösung B: 13,62 g KH_2PO_4 in 1000 ml H_2O

Pufferlösung pH 8,2: 56,5 ml Teile Lösung A
+ 43,5 ml Teile Lösung B

3.4.5 Säulenchromatographische Aminosäurebestimmung an Ionenaustauscherharzen

Die Bestimmung der Aminosäuren in Hydrolysaten und im Plasma wurde säulenchromatographisch an einer Technicon-Apparatur nach der Methode von PIEZ und MORRIS (1960) unter Variation des Puffergradienten und unter Verwendung eines sphärischen Ionenaustauscherharzes (Amberlite-Chromobead A) durchgeführt. Das Verfahren erlaubt bei Verwendung des Ninhydrin-Hydrazin-Reagenz eine gute Trennung der in Nahrungsproteinen regelmäßig vorkommenden 18 Aminosäuren in Konzentrationen von 0,1 - 0,5 μmol pro Aminosäure nach einer Laufzeit von 18 Stunden.

Hierbei wurden folgende Bedingungen eingehalten:

Länge der Säule: 140 cm

Durchmesser der Säule: 0,6 cm

Durchflußgeschwindigkeit: 0,52 ml/min

Temperatur der Säule: 60°C

Zusammensetzung des Ninhydrinreagenz:

10 g Ninhydrin

500 ml Methylglykol

200 ml 4 n Na-acetatlösung pH 5,5

50 ml Eisessig

H₂O ad 1000 ml

Hydrazinlösung: 262 mg Hydrazinsulfat in 1000 ml des Wassers +
1 Tropfen konz. H₂SO₄

Das Verhältnis von Ninhydrin- zur Hydrazinsulfatlösung bei der Analyse zur Bildung von Hydrindantin beträgt 1 : 0,57. Die Anwendung von Hydrazinsulfat hat den Vorteil, daß die Lösungen nicht unter Stickstoff aufbewahrt werden müssen. Die geringere Anfälligkeit gegenüber Lichteinwirkung sowie Oxydation ermöglicht eine bessere Reproduzierbarkeit der Analysendaten.

Pufferzusammensetzung des Autograd zur Erzeugung des Elutionsgradienten

Kammer	Puffer pH 2,81 ml	Na-Citrat (2,4 n) ml	H ₂ O ml	Methanol ml
1	70	-	-	5
2	73	-	-	2
3	75	-	-	-
4	75	-	-	-
5	55	19	-	-
6	40	19	15	-
7	30	10	34	-
8	4	52	16	-
9	-	72	-	-

3.4.6 Tryptophanbestimmung

(Glyoxylsäuremethode nach VANGALA und MENDEN 1970)

2 ml Standardlösung oder Hydrolysat werden mit 1 ml einer frisch bereiteten Mischung von Glyoxylsäurelösung und Kupfersulfatlösung zu gleichen Teilen versetzt. Unter Kühlung (in Eiswasser) werden 8 ml H_2SO_4 zugesetzt und das Gemisch nach 10 min in ein siedendes Wasserbad 3 min lang eingestellt. Die photometrische Bestimmung wird bei 565 ~~nm~~ durchgeführt (Zeiss-Spektralphotometer).

Reagenzien:

Glyoxylsäurelösung: 10 g Magnesiumpulver werden in einem großen Erlenmeyerkolben gerade eben mit H_2O bedeckt. Dann setzt man langsam unter Kühlung mit Wasser 250 ml kalt gesättigte Oxalsäurelösung zu, schüttelt kräftig und filtriert. Das Filter wird mit wenig H_2O nachgewaschen. Man säuert das Filtrat schwach mit Essigsäure an und füllt mit H_2O auf 1 l auf.

0,01 m $Cu SO_4$ -Lösung

60 %ige H_2SO_4

3.4.7 Bestimmung des Leberfettgehaltes

Die Rattenleber wurde zunächst tiefgefroren und gefriergetrocknet (WKF Gefrietrockenanlage d. Fa. Brandau), dann in Aluminiumfolie verpackt und im Exsikkator aufbewahrt. Die Fettextraktion erfolgte nach dem Prinzip von SOXHLET. Die Extraktionshülsen wurden 12 Stunden bei $105^{\circ}C$ getrocknet und 20 min im Exsikkator abgekühlt. Danach wurde das Leergewicht der Hülsen bestimmt und anschließend die gefriergetrocknete Leber eingewogen.

Die Extraktion mit Petroläther wurde 6 Stunden lang am Rückflußkühler durchgeführt. Darauf wurden die Hülsen mit der Leber wiederum 12 Stunden bei $105^{\circ}C$ im Trockenschrank getrocknet, im Exsikkator 20 min abgekühlt und gewogen bis zur Gewichtskonstanz. Aus der Gewichts Differenz vor und nach der Extraktion ergab sich der Leberfettgehalt, der in Prozent des Lebertrockengewichtes berechnet wurde (Methode: F.H. KRATZER, pers. Mitteilung).

3.4.8 Bestimmung der freien Aminosäuren im Blutplasma

Das - nach Chloroform-Narkose - durch Herzpunktion gewonnene und heparinisierte Blut der Tiere wurde 5 min bei 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert und danach das überstehende Plasma abpipettiert. Eine bestimmte Menge des Plasmas wurde im Verhältnis 1:1 mit 8%iger Sulfosalicylsäure versetzt und gut durchgemischt. Anschließend wurde bei 3000 Umdrehungen/min 20 min zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit dekantiert. Die Proben von jeweils 3 - 4 Tieren wurden gepoolt. Davon wurden jeweils 0,5 ml für jede Aminosäurebestimmung nach der vorher beschriebenen Methode verwandt.

3.5 Die histologische Untersuchung der Leber

Die Leberproben wurden in 4%iger Formalinlösung fixiert. Die Untersuchungen erfolgten an Gefrierschnitten, da durch Einbettungsmethoden Fett extrahiert worden wäre. Zur abschließenden Einbettung nach der Färbung dient Glyceringelatine nach MEYER.

Färbemethoden:

Färbung mit "Oil red-O" nach LILLIE und ASHBURN (1943)

Bei der Fettfärbung 10 μ starker Schnitte mit Oil red-O nach der Methode von LILLIE und ASHBURN tritt eine kräftig orange-rote Färbung der Fetteinlagerungen auf.

Durchführung: 6 Teile einer gesättigten Oil red-O Stammlösung (500 mg Oil red-O in 100 ml Isopropylalkohol) wurden mit 4 Teilen dest. Wasser vermischt, 15 min stehengelassen und anschließend abfiltriert. Die so erhaltene Lösung ist nur einen Tag haltbar.

Die Gefrierschnitte wurden zunächst gewässert, 10 min mit Oil red-O angefärbt, wieder gewässert, danach erfolgte die Kernfärbung mit Hämalun nach MAYER (5 min) und anschließend wurden die Schnitte nochmals gewässert.

Färbung mit alkoholischer Sudan III Lösung nach DADDI (1896)

Herstellung der alkoholischen Sudan III Lösung: 0,2-0,3 g Sudan III wurden mit 100 ml heißem 70%igem Alkohol übergossen. Die Lösung wurde für mehrere Stunden gut verschlossen bei 60°C im Thermostat gehalten und dann nach Abkühlung abfiltriert.

Durchführung: Die in dest. Wasser aufgefangenen Gefrierschnitte wurden für wenige Minuten in 50 %igen Alkohol übertragen, anschließend in alkoholischer Sudanlösung 30 min gefärbt und wiederum mit dest. Wasser ausgewaschen. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämalaun nach MAYER.

Ergebnis:

Kerne: blau

Fett: orange-gelb

Darstellung mit Scharlachrot nach HERXHEIMER (1901)

Die in dest. Wasser aufgenommenen Gefrierschnitte wurden 3 min in 50 %igen Alkohol gelegt. Die Färbung erfolgte 3 min in der Aceton-Scharlachlösung nach HERXHEIMER (0,2 - 0,3 g Scharlachrot in 50 ml Aceton + 50 ml 70 %igen Alkohol). Danach wurde kurz in 70 %igem Alkohol abgespült und in H_2O gewaschen. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämalaun nach MAYER.

Ergebnis:

Kerne: blau

Fett: orange-rot

Kernfärbung mit Hämalaun nach MAYER (1904)

Herstellung der Hämalaunlösung: 1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodet und 50 g Kalisalaun wurden in 1000 ml dest. H_2O unter mehrmaligem Umschütteln gelöst. Dabei nahm die Lösung eine blauviolette Färbung an. Nach Zugabe von 50 g Chloralhydrat mit 1 g Citronensäure schlug der Farbton in rotviolett um.

Durchführung: Die Schnitte kamen aus dest. Wasser für 5 min in die Hämalaunlösung. Sodann wurde 10 min in fließendem Wasser gewaschen, da erst hierdurch die tiefblaue Färbung in voller Stärke hervortritt.

Ergebnis:

Kerne: leuchtend blau

Knorpel: Dunkelblau

Das übrige Gewebe ungefärbt.

3.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme des elektronischen Rechners "Diehl Combitron S".

Die Standardabweichung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Die Varianzanalyse wurde nach CAVALLI-SFORZA (1969) durchgeführt. Hierbei wurde von k Gruppen von Meßwerten x_{ij} mit dem Umfang n_i ($i = 1, 2, \dots, k; j = 1, 2, \dots, n_i$) festgestellt, ob die Gruppenmittelwerte $\bar{x}_i$ voneinander abweichen und ob die Abweichung zufällig ist.

Es wurden berechnet:

die Gruppenmittelwerte $\bar{x}_i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij},$

der Mittelwert $\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}$

mit $N = \sum_{i=1}^k n_i,$

die Summen der Abweichungsquadrate

$$\text{SAP 1} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{x} - \bar{x}_i)^2,$$

$$\text{SAP 2} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (\bar{x}_i - x_{ij})^2,$$

deren Summe $\text{SAP} = \text{SAP 1} + \text{SAP 2}$, die Anzahl der Freiheitsgrade

$$(k - 1) \text{ bzw. } (N - k) \text{ bzw. } (N - 1),$$

sowie die Quotienten aus Summe der Abweichungsquadrate und Anzahl der Freiheitsgrade

$$s_1^2 = \frac{\text{SAP 1}}{k - 1}$$

$$s_2^2 = \frac{\text{SAP 2}}{N - k}$$

$$s^2 = \frac{\text{SAP}}{N - 1}.$$

4. Ergebnisse und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte in Tierversuchen an wachsenden Ratten die Auswirkung der Verfütterung von "MAILLARD"-Produkten auf die Entstehung einer Fettleber bei einem Proteingehalt des Futters von 18% untersucht werden. Die Charakterisierung dieser Fettleber, die Ermittlung der Ursachen und die Möglichkeiten zur Verhinderung derartiger alimentär bedingter erhöhter Lipideinlagerungen in der Leber durch Zulagen verschiedener Aminosäuren standen hierbei als Zielsetzung im Vordergrund.

4.1 Aminosäurebestimmungen im Casein- und in MAILLARD-Produkten

4.1.1 Bestimmung in Säure- und Alkalihydrolysaten

Die Ergebnisse der Aminosäurebestimmung in Säure- und Alkalihydrolysaten von Casein und daraus hergestellten MAILLARD-Produkten zeigen beim Vergleich, daß durch die Erhitzung eine teilweise Zerstörung von Lysin und Arginin auftritt und deuten eine Schädigung von Threonin, Methionin sowie Tryptophan an (Tab. 7).

Die außerdem im Chromatogramm der MAILLARD-Produkte auftretenden Peaks vor Histidin, nach Lysin und nach Arginin, die als x_1 , x_2 , x_3 bezeichnet wurden (Abb. 6), konnten bisher nicht identifiziert werden. Es darf vermutet werden, daß es sich hierbei um ninhydrinpositive Reaktionsprodukte von Glukose mit Lysin handelt. Der als x_3 bezeichnete Peak, der eine Stunde nach Elution des Arginin auftritt, ist offensichtlich identisch mit der von BRÜGGEMANN und ERBERSDOBLER (1968) sowie FREIMUTH und TRÜBSBACH (1969a) beschriebenen Substanz. BRÜGGEMANN und ERBERSDOBLER vermuteten, daß es sich hierbei um ein Folgeprodukt von Fructoselysin handelt, das durch saure Hydrolyse entsteht. Nach FREIMUTH und TRÜBSBACH dürfte es sich auf Grund der Ergebnisspektrophotometrischer und massenspektrographischer Untersuchungen um eine stickstoffhaltige, ungesättigte, eine konjugierte Carbonylgruppe enthaltende Verbindung mit dem Molgewicht 212 handeln (siehe 2.1).

Tabelle 7: Aminosäuregehalt von Casein sowie daraus hergestellten MAILLARD-Produkten durch Erhitzung von Casein mit Glukose
g Aminosäure pro 16 g N
Proteinhydrolyse: 6 n HCl und 20 %ige KOH
Aminosäurebestimmung: Säulenchromatographisch,
Try nach der Glyoxylsäuremethode

AS	C (n=2)	Cg ₁ (n=4)	Cg ₂ (n=4)	Cg ₃ (n=2)	Cg ₄ (n=2)
Asp	7,1 $\pm$ 0,54	7,0 $\pm$ 0,62	6,7 $\pm$ 0,03	6,9 $\pm$ 0,04	6,7 $\pm$ 0,01
Thr	3,9 $\pm$ 0,30	3,9 $\pm$ 0,21	3,8 $\pm$ 0,25	3,6 $\pm$ 0,06	3,6 $\pm$ 0,30
Ser	5,3 $\pm$ 0,15	5,6 $\pm$ 0,46	5,5 $\pm$ 0,26	5,1 $\pm$ 0,13	4,3 $\pm$ 0,10
Glu	21,2 $\pm$ 1,00	20,8 $\pm$ 0,68	21,9 $\pm$ 0,71	21,5 $\pm$ 0,16	18,6 $\pm$ 0,52
Pro	10,5 $\pm$ 0,66	10,6 $\pm$ 0,35	10,7 $\pm$ 0,54	10,1 $\pm$ 0,50	9,7 $\pm$ 0,06
Gly	1,9 $\pm$ 0,08	1,9 $\pm$ 0,09	1,9 $\pm$ 0,04	1,9 $\pm$ 0,04	1,9 $\pm$ 0,06
Ala	3,0 $\pm$ 0,16	3,0 $\pm$ 0,19	3,0 $\pm$ 0,16	3,0 $\pm$ 0,00	2,7 $\pm$ 0,17
Val	6,2 $\pm$ 0,16	6,0 $\pm$ 0,35	6,2 $\pm$ 0,16	6,7 $\pm$ 0,24	6,0 $\pm$ 0,26
Cys	1,9 $\pm$ 0,15	1,8 $\pm$ 0,10	2,5 $\pm$ 0,52	2,6 $\pm$ 0,26	2,7 $\pm$ 0,19
Met	4,2 $\pm$ 0,07	4,2 $\pm$ 0,04	5,3 $\pm$ 0,20	5,4 $\pm$ 0,93	1,0 $\pm$ 0,04
Iso	5,4 $\pm$ 0,16	5,6 $\pm$ 0,50	5,5 $\pm$ 0,43	5,3 $\pm$ 0,34	4,9 $\pm$ 0,11
Leu	8,6 $\pm$ 0,64	8,4 $\pm$ 0,64	8,6 $\pm$ 0,59	8,9 $\pm$ 0,96	8,3 $\pm$ 0,33
Tyr	5,2 $\pm$ 0,20	4,6 $\pm$ 0,76	5,0 $\pm$ 0,10	4,6 $\pm$ 0,04	2,8 $\pm$ 0,00
Phe	4,7 $\pm$ 0,15	4,6 $\pm$ 0,43	4,7 $\pm$ 0,23	4,8 $\pm$ 0,07	4,3 $\pm$ 0,33
His	2,8 $\pm$ 0,13	2,2 $\pm$ 0,26	2,4 $\pm$ 0,13	2,3 $\pm$ 0,16	2,0 $\pm$ 0,16
Lys	7,5 $\pm$ 0,20	4,1 $\pm$ 1,07	3,9 $\pm$ 0,10	3,6 $\pm$ 0,00	3,3 $\pm$ 0,00
Arg	3,5 $\pm$ 0,11	2,0 $\pm$ 0,96	1,7 $\pm$ 0,08	1,5 $\pm$ 0,07	1,4 $\pm$ 0,16
Try	2,4 $\pm$ 0,11	1,2 $\pm$ 0,16	1,2 $\pm$ 0,09	1,2 $\pm$ 0,03	1,2 $\pm$ 0,01

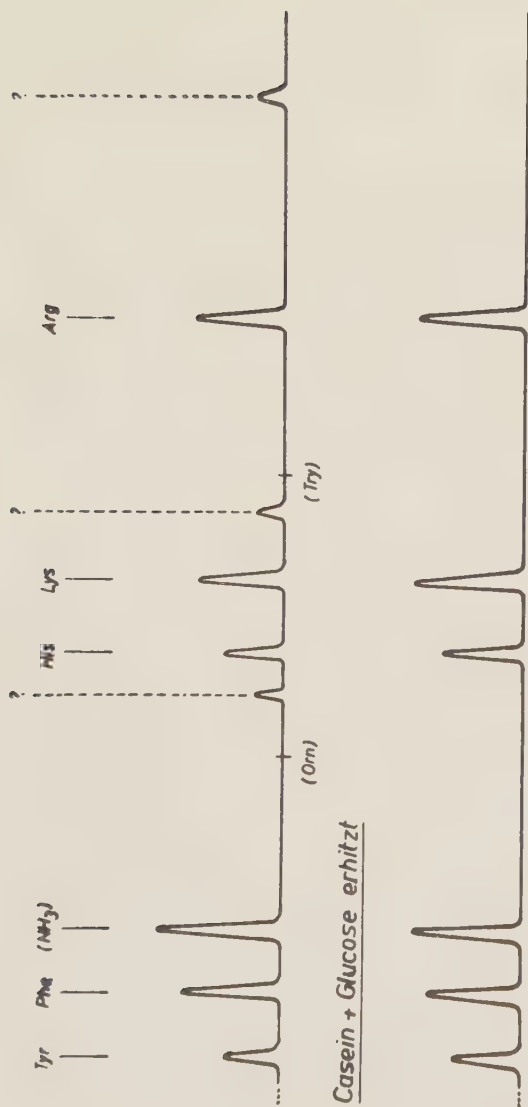
C = Casein (vitaminfrei; Nutritional Biochemicals)

Cg₁ = 500 g Casein + 500 g Glukose + 750 ml H₂O 60 min 140°C

Cg₂ = 500 g Casein + 500 g Glukose + 750 ml H₂O 90 min 140°C

Cg₃ = 500 g Casein + 500 g Glukose + 750 ml H₂O 120 min 140°C

Cg₄ = 500 g Casein + 500 g Glukose + 750 ml H₂O 5 Std 140°C



Casein

Abb. 6: Chromatogramm von Säurehydrolysaten von Casein sowie MAILLARD-Produkten aus Casein und Glukose 90 min 140°C

Der Gehalt des Bräunungsproduktes an Lysin ist gegenüber dem Casein um 48% vermindert, an Tryptophan um 50% und der an Arginin um 47%. Frühere Versuche von LEA und HANNAN (1950), MENDEN und CREMER (1966), ERBERSDOBLER (1967) sowie NARAYANA RAO und McLAUGHLIN (1967) zeigten ähnliche Ergebnisse.

4.1.2 Bestimmung in enzymatischen Hydrolysaten

Da im Verlauf der MAILLARD-Reaktion die Bildung enzymresistenter Bindungen zwischen Glukose und Aminosäuren angenommen wird, die durch Säurehydrolyse aufspaltbar sind, wurden zur Ermittlung von Veränderungen der Verfügbarkeit enzymatische Hydrolysen mit dem polyvalenten Enzymgemisch Pankreatin durchgeführt. Veränderungen der "Verfügbarkeit" einzelner Aminosäuren in MAILLARD-Produkten würden auf Veränderungen der Proteinwertigkeit gegenüber unbehandeltem Casein schließen lassen.

Wie aus Tabelle 8 zu ersehen ist, zeigte sich nach der enzymatischen Hydrolyse eine deutlich verringerte Freisetzung von Lysin gegenüber dem unbehandelten Casein. Die Herabsetzung der Lysinwerte gegenüber Casein um 91% bestätigt die Hypothese, daß Lysin enzymresistente Bindungen mit Glukose eingeht, die durch Säurehydrolyse aufspaltbar sind.

Die chemischen Reaktionen, die zur Bildung enzymresistenter Bindungen führen, sind noch nicht völlig aufgeklärt, jedoch bereits 1945 führten ELDRED und RODNEY die verminderte Verfügbarkeit von Lysin vor allem auf die Bildung enzymresistenter Bindungen der ϵ -Aminogruppe mit anderen reaktionsfähigen Verbindungen zurück. Dies wurde u.a. durch neuere Ergebnisse von BJARNSON et al. (1970) bestätigt. Die Autoren schließen aus der Korrelation der Abnahme von Lysin, der Entwicklung von NH_3 sowie Veränderungen der Amidkonzentration, daß die ϵ -Aminogruppe von Lysin auch mit der Amidgruppe von Asparagin und Glutamin reagiert.

Außer Lysin zeigen Tryptophan (21%) und Arginin (73%) eine deutlich verminderte enzymatische Freisetzung gegenüber dem unbehandelten Casein (siehe auch Abb. 7). Ebenfalls eine Verminderung der Verfügbarkeit von Lysin, Arginin und Tryp-

Tabelle 8: Freisetzung von Aminosäuren aus Casein und daraus hergestellten MAILLARD-Produkten durch Erhitzung von Casein mit Glukose nach enzymatischer Hydrolyse mit Pankrestin
g Aminosäure pro 16 g N

AS	C (n=8)	Cg ₁ (n=4)	Cg ₂ (n=4)	Cg ₃ (n=2)	Cg ₄ (n=2)
Asp	-	-	-	-	-
Thr	0,61 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,04	0,49 $\pm$ 0,04
Ser	0,10 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,01
Glu	-	-	-	-	-
Pro	-	-	-	-	-
Gly	0,10 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,01
Ala	0,20 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,02
Val	0,55 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,04	0,65 $\pm$ 0,03	0,70 $\pm$ 0,01
Cys	-	-	-	-	-
Met	0,71 $\pm$ 0,06	0,54 $\pm$ 0,03	0,60 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,00
Iso	0,41 $\pm$ 0,05	0,55 $\pm$ 0,03	0,55 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,00
Leu	3,08 $\pm$ 0,18	3,07 $\pm$ 0,06	3,18 $\pm$ 0,15	3,05 $\pm$ 0,06	3,07 $\pm$ 0,04
Tyr	2,84 $\pm$ 0,12	2,71 $\pm$ 0,21	2,75 $\pm$ 0,09	2,63 $\pm$ 0,03	2,38 $\pm$ 0,03
Phe	2,26 $\pm$ 0,14	2,20 $\pm$ 0,22	2,34 $\pm$ 0,10	2,20 $\pm$ 0,02	2,09 $\pm$ 0,01
His	0,23 $\pm$ 0,02	-	-	-	-
Lys	2,69 $\pm$ 0,19	0,29 $\pm$ 0,14	0,20 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00
Try	0,95 $\pm$ 0,09	0,56 $\pm$ 0,06	0,67 $\pm$ 0,04	0,58 $\pm$ 0,02	0,50 $\pm$ 0,03
Arg	2,27 $\pm$ 0,35	0,71 $\pm$ 0,47	0,82 $\pm$ 0,04	0,52 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,01

C = Casein (vitaminfrei; Nutritional Biochemicals)

Cg₁ = 500 g Casein + 500 g Glukose + 750 ml H₂O 60 min 140°C
 Cg₂ = 500 g Casein + 500 g Glukose + 750 ml H₂O 90 min 140°C
 Cg₃ = 500 g Casein + 500 g Glukose + 750 ml H₂O 120 min 140°C
 Cg₄ = 500 g Casein + 500 g Glukose + 750 ml H₂O 5 Std 140°C

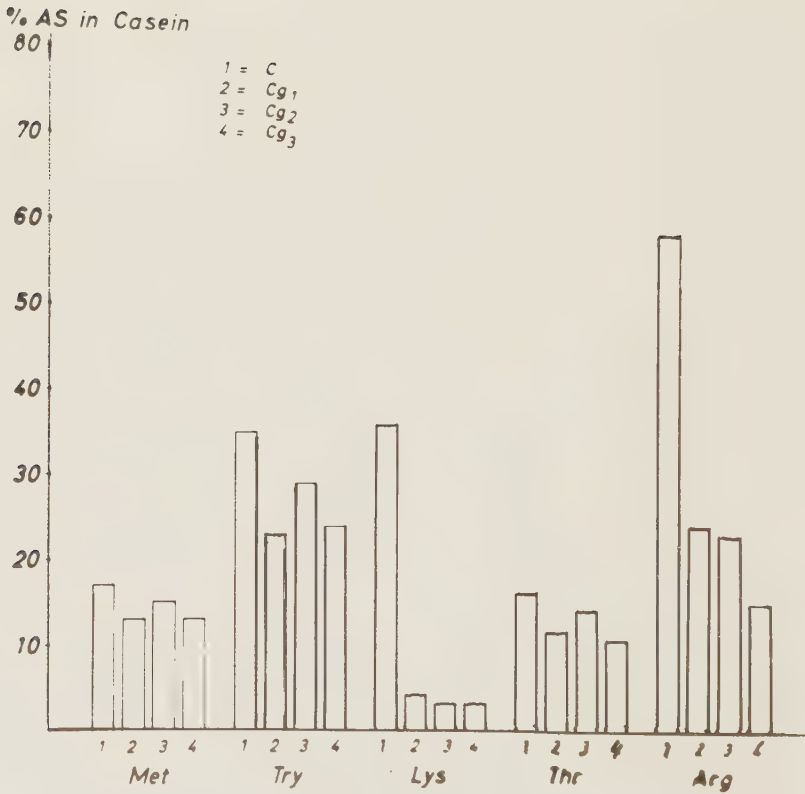


Abb. 7: Enzymatische Freisetzung von Met, Try, Lys, Thr und Arg in % des nach Säure- und Alkalihydrolyse ermittelten Gehaltes dieser Aminosäuren in unbehandeltem Casein.

tophan fanden RENNER et al. (1953) nach Erhitzen von Baumwollsaat sowie RIESEN et al. (1947) nach starkem Erhitzen von Soja.

Die Chromatogramme der enzymatischen Hydrolysate der Bräunungsprodukte zeigen zahlreiche kleine Peptid-Peaks, im Gegensatz zu den Chromatogrammen des unbehandelten Caseins, bei denen in diesem Bereich keine ninhydrinpositive Verbindung auftritt und die Basislinie gerade verläuft. Daraus darf gefolgert werden, daß im Verlauf der MAILLARD-Reaktion die Aminosäuren teilweise in Form von Additions- oder Zwischenprodukten auftreten, während im unbehandelten Casein eine schnellere und vollständigere enzymatische Hydrolyse erfolgt.

Trotz vieler Mängel der enzymatischen Hydrolyse in vitro, die den Vorgang der Verdauung in vivo, verbunden mit dem aktiven Transport der Aminosäuren durch die Mucosa während der Resorption, nie vollständig nachahmen kann, stellt sie doch eine relativ einfache Methode dar, Veränderungen der Proteinwertigkeit zu erfassen und diese dann an Hand der Analysendaten auszugleichen. Daraus wird an Hand der Versuchsergebnisse später noch näher eingegangen werden.

4.2. Tierversuche mit wachsenden Ratten

4.2.1 Gewichtsverhalten der Tiere

Die durchschnittliche Gewichtszunahme während einer Versuchsdauer von 4 Wochen war bei den Tieren der Gruppe, die Bräunungsprodukte erhielten, gegenüber der Kontrollgruppe erheblich vermindert (Tab. 9 und Abb. 8 - 12). Die stärkste Reduktion war nach Verfütterung des für 120 min auf 140°C erhitzten Casein-Glukosegemisches festzustellen (76%). Die durchschnittliche Verminderung in den übrigen Versuchsreihen lag bei 54%. Der sehr viel geringere Einfluß der MAILLARD-Reaktion in Versuchsreihe II (Verminderung um 20%) ist dadurch erklärbar, daß infolge Verwendung einer neuen Casein-Charge mit gröberer Konsistenz der Ablauf der Reaktion gehemmt wurde. Das Produkt wies eine deutlich geringere Braunfärbung auf. Außerdem konnten hier nur Tiere mit höherem Anfangsgewicht eingesetzt werden (siehe S. 62.).

Tabelle 9: Der Einfluß einer MAILLARD-Reaktion des Futterproteins und der Anreicherung mit Aminosäuren auf die Gewichtszunahme von Ratten
g Gewichtszunahme nach 4 Wochen Versuchsdauer; Mittelwerte von je 10-12 Tieren
Proteinanteil im Futter: 18,25 % (N x 6,25)

Gruppeneinteilung		Versuchsreihen				
nach	Proteinzufuhr	I	II	III	IV	V
20 %	Casein	137,15 $\pm$ 7,59 ^{s)}	139,65 $\pm$ 14,50	141,75 $\pm$ 14,07	146,94 $\pm$ 13,86	142,71 $\pm$ 19,34
	Cas.+Gluk.erh.*	57,50 $\pm$ 9,30	110,55 $\pm$ 14,99	---	---	---
	Cas.+Gluk.erh.**	---	---	---	---	---
	Cas.+Gluk.erh.***	---	---	33,90 $\pm$ 15,77	---	---
	Cas.+Gluk.erh.*	---	---	---	52,50 $\pm$ 20,81	64,60 $\pm$ 9,65
	Cas.+Gluk.erh.*	---	---	---	---	---
	+ Lys, Met, Try	---	---	---	---	---
	Cas.+Gluk.erh.*	---	---	---	---	---
	+ Lys, Met, Try	---	---	85,20 $\pm$ 12,38	---	---
	Cas.+Gluk.erh.*	---	---	---	---	---
	+ Lys, Met, Try	---	---	---	96,75 $\pm$ 17,18	---
	Cas.+Gluk.erh.d)	---	---	---	---	---
	+ Lys, Try, Met	---	---	---	114,05 $\pm$ 35,96	---
	Cas.+Gluk.erh.*	---	---	---	---	---
	+ Lys, Thr, Try, Met	---	---	---	101,65 $\pm$ 14,03	114,95 $\pm$ 10,03
	Cas.+Gluk.erh.*	---	---	---	---	---
	+ Arg, Lys, Thr, Try, Met	---	---	---	---	123,00 $\pm$ 9,80
	Cas.+Gluk.erh.*	---	---	---	---	---
	+ Arg, His, Lys, Met, Try	---	---	---	---	133,83 $\pm$ 10,40
	20% Casein + 5%***	---	---	144,95-9,36	---	---
	Cas.+Gluk.erh.i	---	---	---	---	---

* 60 min 140° C; Proteinzufuhr nach N-Gehalt entsprechend 20% Casein s) = Standardabweichung
 ** 120 min 140° C; " " " " "
 *** 90 min 140° C; " " " " "
 **** 5 Std. 140° C; " " " " " d) = doppelte Menge

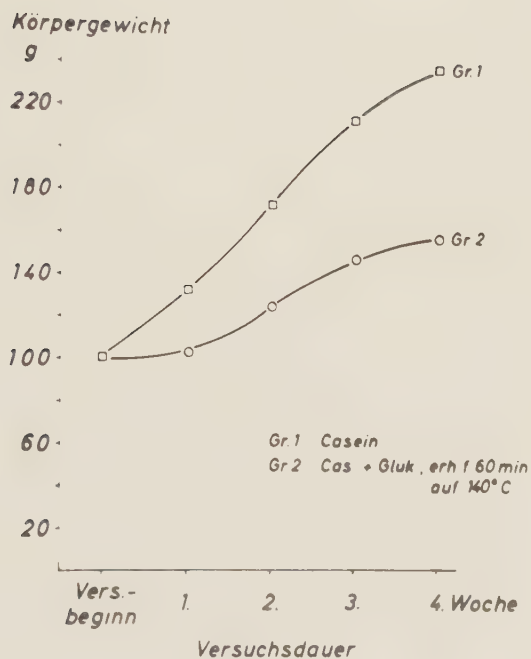


Abb. 8: Zunahme des Körpergewichts wachsender Ratten;
Versuchsreihe I
(Futterzusammensetzung s. Tab. 6)

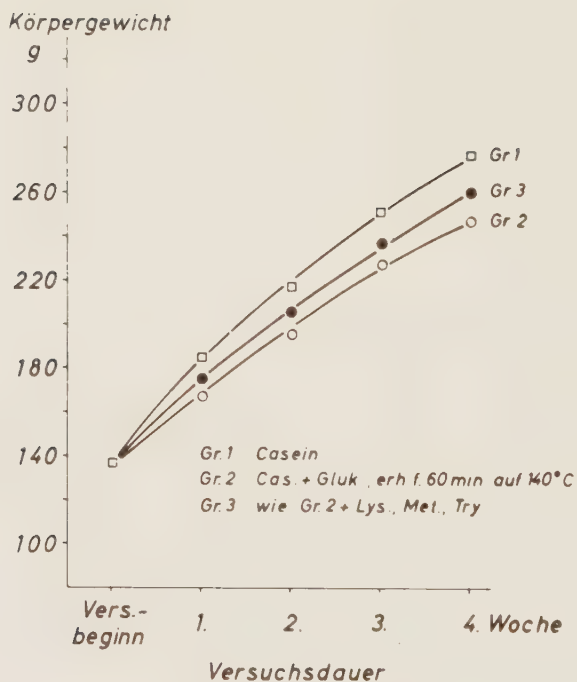


Abb. 9: Zunahme des Körpergewichts wachsender Ratten;
Versuchsreihe II
(Futterzusammensetzung s. Tab. 6)

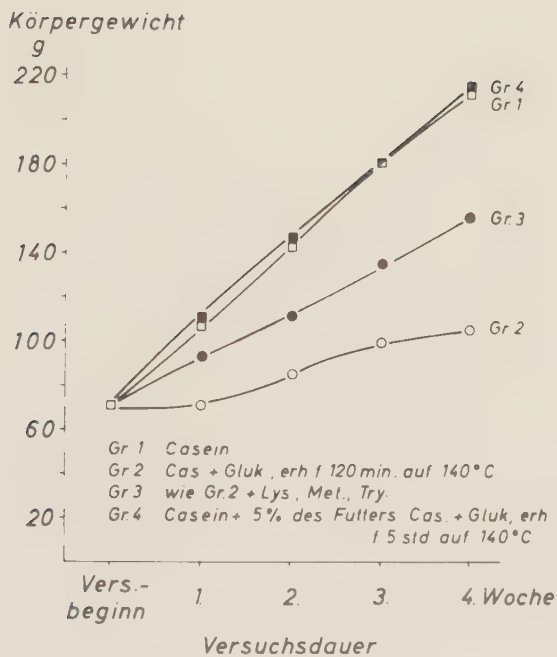


Abb. 10: Zunahme des Körpergewichts wachsender Ratten;
 Versuchsreihe III
 (Futterzusammensetzung s. Tab. 6)

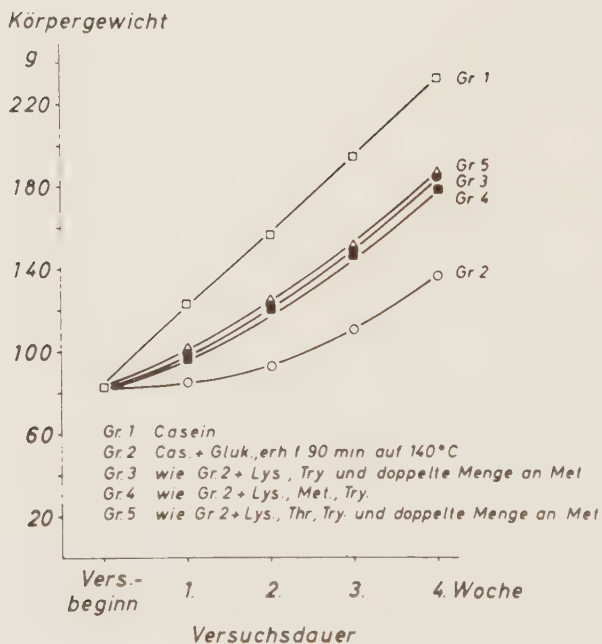


Abb. 11: Zunahme des Körpergewichts wachsender Ratten;
 Versuchsreihe IV
 (Futterzusammensetzung s. Tab. 6)

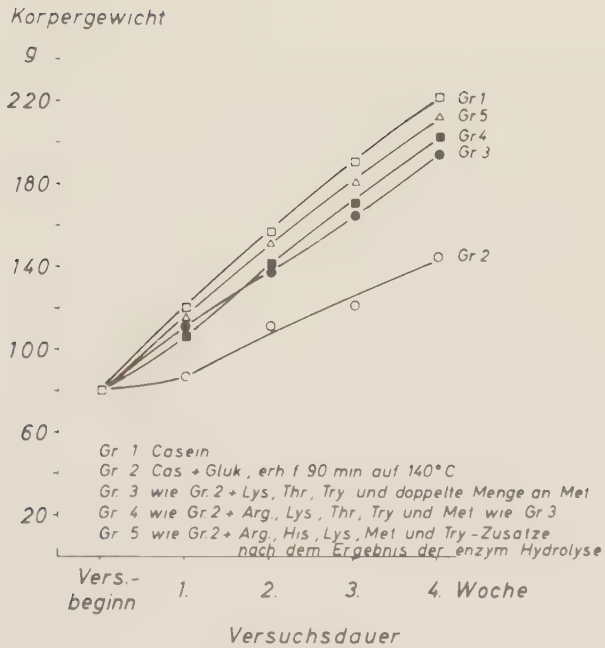


Abb. 12: Zunahme des Körpergewichts wachsender Ratten;
 Versuchsreihe V
 (Futterzusammensetzung s. Tab. 6)

Durch Aminosäurezulagen auf Grund von Erfahrungswerten bzw. Literaturangaben anderer Autoren, auf Grund der Ergebnisse von Aminosäurebestimmungen in den verfütterten Proteinen oder auf Grund des Vergleichs der Freisetzung von Aminosäuren durch enzymatische Hydrolyse in unbehandeltem und in behandeltem Protein konnte die Zunahme des Körpergewichts verbessert werden. Während eine Zulage von Lys, Met und Try bei dem schwach gebräunten Casein (Versuchsreihe II) nur geringen Einfluß hatte (Verbesserung gegenüber der MAILLARD-Produkt-Gruppe ohne Aminosäurezulagen nur 12%), war bei der III. Versuchsreihe mit stärker erhitztem Protein (120 min 140°C) durch Zulagen von L-Lysin, L-Methionin und L-Tryptophan eine Verbesserung der Gewichtszunahme um 125% festzustellen. Trotzdem wurden nur 60% des Körpergewichts der Kontrolltiere erreicht.

In der IV. Versuchsreihe (90 min 140°C) bewirkten Zulagen von L-Lysin, L-Methionin und L-Tryptophan ebenfalls eine erhebliche Verbesserung der Gewichtszunahme, die jedoch auch hier noch um 33% niedriger lag als bei den Kontrolltieren. Eine weitere L-Threoninzulage zeigte keine Wirkung.

In der V. Versuchsreihe führte die Zulage von Arginin zu den bereits genannten Aminosäuren zu einer deutlichen Verbesserung des Wachstums. Die Gewichtszunahme der Tiere lag nur noch um 19% unter der Gewichtszunahme der Kontrollgruppe. Eine weitere Gruppe in Versuchsreihe V erhielt ein Futter, in dem das Bräunungsprodukt entsprechend den Ergebnissen der enzymatischen Hydrolyse (s. Tab. 8) mit L-Arginin (0,5%), L-Histidin (0,1%), L-Lysin (1,2%), L-Methionin (0,2%) und L-Tryptophan (0,1%) angereichert wurde. Hierdurch konnte der Einfluß der MAILLARD-Reaktion auf die Proteinqualität vollständig ausgeglichen werden. Die Gewichtszunahme der Tiere entsprach nun praktisch der Gewichtszunahme der Kontrollgruppe.

Die statistische Auswertung nach der Varianzanalyse in den Versuchsreihen IV und V ergab folgende signifikante Unterschiede:

Versuchsreihe IV:

($P < 0,01$)	Gruppe 1 $\longrightarrow$ Gruppe 2	Gruppe 2 $\longrightarrow$ Gruppe 3
	Gruppe 1 $\longrightarrow$ Gruppe 3	Gruppe 2 $\longrightarrow$ Gruppe 4
	Gruppe 1 $\longrightarrow$ Gruppe 4	Gruppe 2 $\longrightarrow$ Gruppe 5
	Gruppe 1 $\longrightarrow$ Gruppe 5	

Die Unterschiede zwischen diesen Gruppen sind hoch signifikant, während die Gruppen 3 $\longrightarrow$ 4, 3 $\longrightarrow$ 5 keine signifikanten Unterschiede aufweisen.

Versuchsreihe V:

($P < 0,01$)	Gruppe 1 $\longrightarrow$ Gruppe 2	Gruppe 2 $\longrightarrow$ Gruppe 3
	Gruppe 1 $\longrightarrow$ Gruppe 3	Gruppe 2 $\longrightarrow$ Gruppe 4
	Gruppe 1 $\longrightarrow$ Gruppe 4	Gruppe 2 $\longrightarrow$ Gruppe 5
		Gruppe 3 $\longrightarrow$ Gruppe 5

Zwischen diesen Gruppen liegen hochsignifikante Unterschiede vor. Zwischen den Gruppen 1 $\longrightarrow$ 5 waren die Unterschiede dagegen nicht signifikant.

Die Bewertung der Anreicherung mit Aminosäuren auf Grund des Vergleichs der Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse hat sich damit bei Wachstumsversuchen an Ratten den Methoden der Zugabe von Aminosäurezusätzen nach "Erfahrungswerten" oder nach dem Ergebnis der Aminosäurebestimmung in Säure- bzw. Alkalihydrolysaten überlegen gezeigt. Dies wird bestätigt durch den signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen den Gruppen 4 und 5. Gruppe 5 zeigt eine signifikant höhere Gewichtszunahme als Gruppe 4. Ein Zusatz von Threonin erwies sich nicht als notwendig.

Zwischen Gruppe 3 und 4 liegen keine signifikanten Unterschiede vor, wenn auch der Verlauf der Gewichtskurven (Abb. 12) eindeutig die Verbesserung der Gewichtszunahme bei Gruppe 4 gegenüber Gruppe 3 durch den Zusatz von Arginin beweist. Die Versuchsergebnisse bestätigen die Erwartung, daß die Erhitzungsdauer im Verlauf der MAILLARD-Reaktion Einfluß auf die Veränderung der Proteinqualität und damit auf dessen Verwertbarkeit für die wachsende Ratte hat.

Vermindert es Wachstum nach Verfütterung von hitzegeschädigtem Protein ist seit langem bekannt. MORGAN (1931) stellte an jungen Ratten, die erhitztes Weizengluten erhielten,

Wachstumsverzögerungen fest. WEAST et al. kamen 1948 in Versuchen an Hunden zu ähnlichen Ergebnissen. Als Ursache wird vor allem eine teilweise Zerstörung des Lysins angenommen. Ein um 25% vermindertes Wachstum bei Ratten konstatierte KRUG (1960) aber auch bei Versuchen, in denen MAILLARD-Produkte verfüttert wurden, die Proteinzufuhr von Kontroll- und Versuchstieren jedoch lysinäquivalent war. Als Ursache hierfür nimmt er einen allgemeinen "Stoffwechselantagonismus" an. Danach sind Verbindungen von Aminosäuren und Kohlenhydraten als Träger einer Antiaminosäurewirkung zu betrachten.

Sicher ist eine zusätzliche toxische Wirkung von Bräunungsprodukten nicht auszuschließen (KRUG 1960; LANG et al. 1960). Wie das Ergebnis der Gruppe 4 der III. Versuchsreihe (Abb. 10) zeigt, führte aber der Zusatz von 5% eines sehr stark erhitzten schwarzbraunen MAILLARD-Produkts zu keiner Beeinträchtigung des Wachstums, was vermuten läßt, daß keine oder nur eine sehr geringe toxische Wirkung vorliegt. Die Verminderung des Körpergewichts bei der Verfütterung von MAILLARD-Produkten an wachsende Ratten hat wahrscheinlich zwei Ursachen: verringerte Futteraufnahme und verminderte Verfügbarkeit der Aminosäuren infolge Blockierung durch Bildung enzymresistenter Bindungen. Beide Vorgänge führen zu einer Aminosäure-Imbalanz, die durch Aminosäurezulagen teilweise oder auch ganz (Versuchsreihe V, Gruppe 5) behoben werden kann.

Nach Zusatz von L-Lysin, L-Methionin und L-Tryptophan zeigt sich eine deutliche Wachstumsverbesserung (Abb. 9 u. 10), weniger ausgeprägt in Versuchsreihe II. Die Tiere dieser Versuchsreihe (Abb. 9) weisen jedoch ein bedeutend höheres Anfangsgewicht auf als die Ratten der nachfolgenden Versuche. Es ist daher anzunehmen, daß sich aus diesem Grund die Verfütterung des nur schwach gebräunten Produktes nicht so stark auf das Wachstum auswirkte wie bei den anderen Versuchsreihen, da der Proteinbedarf für das Wachstum nicht so hoch wie bei den jungen wachsenden Ratten war und außerdem die kurze Erhitzungszeit eine relativ geringfügigere Veränderung der Proteinwertigkeit verursachte. Dage-

gen verläuft, wie aus Abb. 10 zu ersehen ist, bei den jüngeren Tieren, die in Versuchsreihe III das 120 min erhitzte Bräunungsprodukt erhielten, die Wachstumskurve deutlich flacher als die der Kontrolle sowie der Gruppe, die L-Lysin-, L-Methionin- sowie L-Tryptophan-Zulagen erhielten.

Besonderes Interesse beansprucht das Ergebnis der V. Versuchsreihe, bei der in den Gruppen 4 und 5 eine deutliche Verbesserung des Wachstums nach einer zusätzlichen Arginin-gabe nachweisbar war (Abb. 12). Diese Wirkung des L-Arginin ist wohl darauf zurückzuführen, daß Arginin für die wachsende Ratte eine essentielle Aminosäure ist. Junge Ratten sind auf eine Argininzufuhr angewiesen, da sie ihren Argininbedarf nicht durch ihren eigenen Stoffwechsel voll decken können (BORMAN et al. 1946). Eine Argininzulage kann daher eine Wachstumsverbesserung zur Folge haben. Die Beeinträchtigung der Argininzufuhr und damit des Argininstoffwechsels durch eine MAILLARD-Reaktion des Proteins war bisher allerdings nicht bekannt bzw. im Tierversuch noch nicht nachgewiesen.

Gegen die beobachtete Wirkung des Arginins scheint zu sprechen, daß Arg und Lys sich bei der intestinalen Resorption kompetitiv hemmen. An Meerschweinchen und an Ratten wurde festgestellt, daß die durch hohe Lysingaben verursachte Wachstumsdepression durch Arginin verhindert werden konnte (O'DELL und REGAN 1963, ACHEAMPONG-MENSAK und HILL 1970). Neuere Arbeiten von CHEEKE und STANGEL (1971) zeigen dagegen, daß bei lysinarmer Kost Argininzulage zu einer Wachstumsdepression führt. HARPER et al. (1970) vermuten, daß derartige Wachstumsverminderungen nicht allein durch eine kompetitive Hemmung bei der Resorption erklärbar sind.

4.2.2 Futtermittelverbrauch

In allen Versuchsreihen war der Futterverbrauch der Gruppen, die MAILLARD-Produkte erhielten, signifikant niedriger als der Futterverbrauch der Kontrollgruppen (Tab. 10-13). In Versuchsreihe II betrug diese Verminderung 13%, in Versuchsreihe III 38%, in den Versuchsreihen IV und V 34 bzw. 24%. Die Zulage von Aminosäuren reduzierte dieses Absinken des Futterverzehr. In Versuchsreihe V konnte der Futter-

Tabelle 10: Versuchsreihe II; Futterverbrauch in g pro Woche

Gruppe	1.Woche	2.Woche	3.Woche	4.Woche	Summe
1 Casein	110,60	110,15	129,25	131,25	481,25 $\pm$ 31,92
2 Cas.+Gluk. erh.*	97,20	107,50	120,20	116,30	441,20 $\pm$ 41,53
3 Cas.+Gluk. erh.* +Lys, Met, Try	102,15	108,30	123,10	122,35	456,00 $\pm$ 37,33

* Casein + Glukose 60 min 140°C

Tabelle 11: Versuchsreihe III; Futterverbrauch in g pro Woche

Gruppe	1.Woche	2.Woche	3.Woche	4.Woche	Summe
1 Casein	68,79	104,15	105,23	122,80	398,20 $\pm$ 41,43
2 Cas.+Gluk. erh.*	42,67	64,94	66,20	60,43	235,23 $\pm$ 39,29
3 Cas.+Gluk. erh.* +Lys, Met, Try	57,00	83,50	81,90	82,33	313,90 $\pm$ 35,59
4 Casein + 5% Cas.+Gluk. erh.**	69,75	104,94	98,64	121,11	394,45 $\pm$ 12,97

* Casein + Glukose 120 min 140°C

** Casein + Glukose 5 Std 140°C

Tabelle 12: Versuchsreihe IV; Futterverbrauch in g pro Woche

Gruppe	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	Summe
1 Casein	89,2 $\pm$ 9,2	100,7 $\pm$ 10,9	113,8 $\pm$ 12,8	121,9 $\pm$ 8,2	425,7 $\pm$ 35,3
2 Cas.+Gluk.erh.*	51,5 $\pm$ 6,7	69,1 $\pm$ 8,4	80,9 $\pm$ 12,8	88,4 $\pm$ 18,9	281,9 $\pm$ 48,8
2 Cas.+Gluk.erh. +Lys, Met ^d , Try	70,0 $\pm$ 12,4	92,3 $\pm$ 10,8	102,6 $\pm$ 13,1	116,1 $\pm$ 14,7	381,0 $\pm$ 46,2
4 Cas.+Gluk.erh.* +Lys, Met, Try	65,6 $\pm$ 10,8	88,9 $\pm$ 14,4	105,4 $\pm$ 11,7	107,2 $\pm$ 14,2	358,4 $\pm$ 59,4
5 Cas.+Gluk.erh.* +Lys, Met ^d , Thr, Try	66,5 $\pm$ 8,6	89,5 $\pm$ 9,4	103,2 $\pm$ 5,9	117,6 $\pm$ 10,2	376,7 $\pm$ 24,1

*) Casein + Glukose 90 min 140° C

d) = doppelte Menge

Tabelle 13: Versuchereihe V; Futterverbrauch in g pro Woche

Gruppe	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	Summe
1 Casein	90,3 [±] 10,5	107,5 [±] 13,9	110,6 [±] 14,7	116,6 [±] 18,1	425,1 [±] 44,3
2 Cas.+Gluk.erh.*	64,4 [±] 6,2	78,7 [±] 7,6	84,7 [±] 5,5	93,6 [±] 11,9	321,3 [±] 23,0
3 Cas.+Gluk.erh.* +Lys, Met ^d), Thr, Try	88,7 [±] 6,4	97,2 [±] 8,8	110,6 [±] 6,8	116,9 [±] 4,0	413,4 [±] 16,0
4 Cas.+Gluk.erh.* +Arg, Lys, Met ^d), Thr, Try	90,1 [±] 9,1	101,8 [±] 9,8	107,1 [±] 11,5	116,1 [±] 13,8	415,2 [±] 40,0
5 Cas.+Gluk.erh.* +Arg, His, Lys, Met, Try	88,7 [±] 7,0	101,4 [±] 7,3	110,1 [±] 8,5	114,3 [±] 9,6	414,5 [±] 24,7

*) = Casein + Glukose 90 min 140° C

d) = doppelte Menge

verbrauch der Gruppen 3, 4 und 5 durch Aminosäurezulagen auf die gleiche Höhe wie der Futterverbrauch der Kontrollgruppe angehoben werden. Die Auswertung in den Versuchsreihen IV und V nach der Varianzanalyse zeigte folgende Ergebnisse:

Versuchsreihe IV:

$(P \ll 0,01)$	Gruppe 1 $\longrightarrow$ Gruppe 2	Gruppe 2 $\longrightarrow$ Gruppe 3
	Gruppe 1 $\longrightarrow$ Gruppe 4	Gruppe 2 $\longrightarrow$ Gruppe 4
		Gruppe 2 $\longrightarrow$ Gruppe 5
$(P \ll 0,05)$	Gruppe 1 $\longrightarrow$ Gruppe 3	
	Gruppe 1 $\longrightarrow$ Gruppe 5	

Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich zwischen den Gruppen 3 $\longrightarrow$ 4, 3 $\longrightarrow$ 5 und 4 $\longrightarrow$ 5.

Versuchsreihe V:

$(P \ll 0,01)$	Gruppe 1 $\longrightarrow$ Gruppe 2	Gruppe 2 $\longrightarrow$ Gruppe 3
		Gruppe 2 $\longrightarrow$ Gruppe 4
		Gruppe 2 $\longrightarrow$ Gruppe 5

Zwischen den übrigen Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen.

Auch KRUG (1960) fand einen geringeren Futterverzehr (-15%) bei Ratten, nachdem das Futterprotein einer MAILLARD-Reaktion ausgesetzt war. Er führte diesen Abfall auf eine Verschlechterung des Geschmacks zurück. Er stellt gleichzeitig eine ausgeprägte Aminosäure-Imbalanz anhand der chromatographischen Aminosäurebestimmung im Urin fest. Auf Grund der Plasma-Aminosäure-Werte (siehe 4.2.6) kann auch in den Versuchsreihen I - V auf eine Aminosäure-Imbalanz geschlossen werden. Eine Beeinflussung des Futterverbrauchs durch den verschlechterten Geschmack ist auf Grund des Ergebnisses der Gruppe 4 in Versuchsreihe III unwahrscheinlich. Nach HARPER und ROGERS (1965) ist dagegen eine verminderte Futtersaufnahme eine der charakteristischen "adverse effects" einer Aminosäure-Imbalanz.

4.2.3 Körpergewicht in Relation zum Futterverbrauch und "Protein Efficiency Ratio"

Der Futterverbrauch pro g Gewichtszunahme geht aus den Tabellen 14 - 17 hervor.

Tabelle 14: Versuchsreihe II: Futterverbrauch in g pro g Gewichtszunahme

Gruppe	g Futter pro g Gewichtszunahme
1 Casein	3,44
2 Cas.+Gluk.erh. *	3,97
3 Cas.+Gluk.erh. *	3,65
+ Lys, Met, Try	

*) = Casein + Glukose 60 min 140° C

Tabelle 15: Versuchsreihe III: Futterverbrauch in g pro g Gewichtszunahme

Gruppe	g Futter pro g Gewichtszunahme
1 Casein	2,81
2 Cas.+Gluk.erh. *	8,02
3 Cas.+Gluk.erh. *	3,72
+ Lys, Met, Try	
4 Casein	2,73
+ 5% Cas.+Gluk.erh. **	

*) = Casein + Glukose 120 min 140° C

**) = Casein + Glukose 5 Std 140° C

Tabelle 16: Versuchsreihe IV: Futterverbrauch in g pro g Gewichtszunahme

Gruppe	g Futter pro g Gewichtszunahme
1 Casein	2,84
2 Cas.+Gluk.erh. *	5,46
3 Cas.+Gluk.erh. *	2,65
+ Lys, Met ^{d)} , Try	
4 Cas.+Gluk.erh. *	3,79
+ Lys, Met, Try	
5 Cas.+Gluk.erh. *	3,71
+ Lys, Met ^{d)} , Thr, Try	

*) = Casein + Glukose 90 min 140°C

d) = doppelte Menge

Tabelle 17: Versuchsreihe V: Futterverbrauch in g pro g Gewichtszunahme

Gruppe	g Futter pro g Gewichtszunahme
1 Casein	2,98
2 Cas.+Gluk.erh. *	4,97
3 Cas.+Gluk.erh. *	3,60
+ Lys, Met ^{d)} , Thr, Try	
4 Cas.+Gluk.erh. *	3,38
+ Arg, Lys, Met ^{d)} , Thr, Try	
5 Cas.+Gluk.erh. *	3,10
+ Arg, His, Lys, Met, Try	

*) = Casein + Glukose 90 min 140°C

d) = doppelte Menge

Die Ergebnisse der Bewertung des Futterverbrauchs pro g Gewichtszunahme bestätigen die erwartete deutlich verminderte Futter- bzw. Proteinausnutzung durch den Einfluss einer MAILLARD-Reaktion auf das Futterprotein. Lediglich

in der Versuchsreihe II ist nur ein geringer Unterschied im Futterverbrauch pro g Zunahme zwischen den Gruppen 1 und 2 festzustellen (Tab. 14). Wie im Vorhergehenden bereits ausgeführt, kann dies einerseits auf die Verwendung einer anderen Casein-Charge mit größerer Struktur und damit auf eine verringerte Bildung von MAILLARD-Produkten, andererseits auf das höhere Anfangsgewicht der Versuchstiere zurückgeführt werden.

Es wird deutlich, daß die MAILLARD-Reaktion zur Bildung enzymresistenter Bindungen und dadurch zu einer verringerten Verfügbarkeit von Aminosäuren führt. Die Proteinzufuhr lag in allen Versuchsreihen mit durchschnittlich 18% in einer Größenordnung, die Proteinmangelerscheinungen üblicherweise ausschließt. Auch die analytisch nach Säure- bzw. Alkali-hydrolyse ermittelte Zufuhr an essentiellen Aminosäuren lag erheblich über dem Bedarf der Ratte (s. Tab. 18 u. 19).

Tabelle 18: AS-Muster im Futter wachsender Ratten in
g/ 100 g Futter
Versuchsreihe IV

AS	Bedarf ⁺	Gruppen				
		1	2	3	4	5
Lys	0,90	1,62	0,80	1,40	1,40	1,40
Try	0,15	0,48	0,24	0,34	0,34	0,34
Iso	0,55	1,22	1,15	1,15	1,15	1,15
Val	0,55	1,28	1,29	1,29	1,29	1,29
Thr	0,50	0,90	0,80	0,80	0,80	1,10
Leu	0,70	1,84	1,78	1,78	1,78	1,78
His	0,25	0,66	0,49	0,49	0,49	0,49
Met+Cys	0,50	1,22	1,76	1,96	1,76	1,96
Phe+Tyr	0,72	2,08	1,98	1,98	1,98	1,98
Arg	0,21	0,74	0,48	0,48	0,48	0,48

Tabelle 19: AS-Muster im Futter wachsender Ratten in
g/100 g Futter
Versuchsreihe V

AS	Bedarf ⁺	Gruppen				
		1	2	3	4	5
Lys	0,90	1,52	0,79	1,39	1,39	1,99
Try	0,15	0,47	0,23	0,33	0,33	0,33
Iso	0,55	1,08	1,03	1,03	1,03	1,03
Val	0,55	1,28	1,26	1,26	1,26	1,26
Thr	0,50	0,81	0,78	1,08	1,08	0,78
Leu	0,70	1,59	1,56	1,56	1,56	1,56
His	0,25	0,58	0,46	0,46	0,46	0,56
Met+Cys	0,50	1,47	1,28	1,48	1,48	1,28
Phe+Tyr	0,72	1,93	1,88	1,88	1,88	1,88
Arg	0,21	0,71	0,37	0,37	0,67	0,87

⁺) = RAO, P.B.R. et al. (1961)

Aus der Gegenüberstellung in den Tabellen 18 und 19, die das Aminosäuremuster in g/100 g Futter wiedergeben, wird deutlich, daß der Bedarf der Ratten an allen essentiellen Aminosäuren einschließlich Arginin und Histidin auch bei einem um 38% reduzierten Futtermittelverbrauch (Versuchsreihe III, Gruppe 2) hätte dennoch gedeckt sein müssen, mit Ausnahme des Lysins in dieser Gruppe.

Die Aminosäurezulagen bewirkten eine erhebliche Verbesserung der Futterausnutzung, während ein Gehalt von 5% stark erhitzter Casein-Glukose-Mischung die Futterverwertung nicht beeinträchtigte.

Es erscheint besonders bemerkenswert, daß eine Anreicherung mit Aminosäuren, die mengenmäßig auf Grund der Ergebnisse eines Vergleichs enzymatischer Hydrolysen in Versuchsreihe V, Gruppe 5 vorgenommen wurde, die Ausnutzung am deutlichsten verbesserte. Wie an den Wachstumskurven bereits zu erkennen war, ist auch in diesem Ergebnis eine Bestätigung für die Anwendbarkeit der Ergebnisse einer enzymatischen Hydrolyse in vitro auf die Bewertung von Veränderungen der

Proteinwertigkeit und damit auf eine Ergänzung durch bestimmte Aminosäuren zu sehen.

Die Berechnung der "Protein Efficiency Ratio" zeigt im wesentlichen die gleiche Tendenz (Tab. 20).

Tabelle 20: "Protein Efficiency Ratio"¹⁾

g Gewichtszunahme pro g Proteinaufnahme
(Versuchsreihe II - V)

Vers.reihe II		Vers.reihe III		Vers.reihe IV		Vers.reihe V	
Gruppen	PER	Gruppen	PER	Gruppen	PER	Gruppen	PER
1	1,46	1	1,77	1	1,76	1	1,68
2	1,25	2	0,72	2	0,81	2	1,01
3	1,37	3	1,40	3	1,32	3	1,38
		4	1,83	4	1,32	4	1,48
				5	1,22	5	1,62

1) nach RAO et al. (1961): g Gewichtszunahme /g Protein-
zufuhr ($N \times 6,25$)

In allen Versuchen ist die Proteinausnutzung der Tiere, die mit der erhitzten Casein-Glukose-Mischung gefüttert wurden, erheblich schlechter als in den Kontrollgruppen sowie in den mit Aminosäuren angereicherten Gruppen. Bei den letzteren zeigt sich in der V. Versuchsreihe bei Gruppe 4 eine leichte Verbesserung der PER gegenüber Gruppe 3. Ganz deutlich ist die Wirkung der Anreicherung entsprechend der enzymatischen Hydrolyse auf die PER in Gruppe 5 zu sehen. Der Wert der PER in dieser Gruppe entspricht praktisch dem Wert der Kontrollgruppe.

4.2.4 Lipidgehalt der Leber

Bei den Ratten der Versuchsreihe I, in der zunächst die Auswirkung einer MAILLARD-Reaktion auf die Proteinausnutzung und auf die Resorption von Aminosäuren untersucht werden sollte, war makroskopisch eine gelblich-blasse Verfärbung der Leber bei Tieren mit MAILLARD-Produkten im Futter im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe aufgefallen.

Eine Bestimmung des Fettgehaltes bestätigte die auf Grund dessen vermutete erhöhte Lipideinlagerung (Tab. 21).

Tabelle 21: Leberfettgehalt in % Trockengewicht
Versuchsreihe I

Gruppe	Lipide in % Trockengewicht
1 Casein	10,4 % s = $\pm$ 0,3
2 Cas.+Gluk.erh.*	33,8 % s = $\pm$ 4,1

*) = 60 min 140° C

Im Zusammenhang mit den Auswirkungen einer MAILLARD-Reaktion bei relativ hoher Proteinzufuhr (18%) war dieser Erscheinung in der Literatur bisher keine Beachtung geschenkt worden. Die Lipideinlagerung in der Leber wurde daher im Folgenden in den Mittelpunkt der Untersuchungen gestellt.

In einer zweiten Versuchsreihe zeigten sich zunächst wesentlich geringere Differenzen im Leberfettgehalt (Tab. 22).

Tabelle 22: Leberfettgehalt in % Trockengewicht
Versuchsreihe II

Gruppe	Lipide in % Trockengewicht
1 Casein	9,5 % (Einzelwerte 7,7 - 11,3)
2 Cas.+Gluk.erh.*	12,6 % (" 7,9 - 24,6)
3 Cas.+Gluk.erh.* + Lys, Met, Try	16,6 % (" 7,4 - 35,7)

*) = 60 min 140° C

Die Ursache hierfür dürfte - wie in Abschnitt 4.2.1 bereits ausgeführt - in der Verwendung einer anderen Casein-Charge mit größerer Konsistenz und hierdurch auch erkennbar geringerer MAILLARD-Reaktion sowie in der Verwendung von Tieren mit erheblich höherem Gewicht zu Beginn des Versuchs zu suchen sein. Überraschend war jedoch, daß bei den Tieren der 3. Gruppe, die eine Zulage der Aminosäuren

Lys, Met und Try erhalten hatten, parallel mit einer Erhöhung der Körpergewichtszunahme eine merkbar höhere Fetteinlagerung in der Leber festzustellen war. Diese Beobachtung ließ auf den Einfluß einer Aminosäure-Imbalanz schließen.

In einer dritten Versuchsreihe wurde die Erhitzungsdauer der Casein-Glukose-Mischung verlängert, um einen stärkeren Bräunungseffekt zu erzielen. Außerdem konnten wieder Tiere mit geringerem Anfangsgewicht eingesetzt werden. Die Ergebnisse der Bestimmung des Leberfettgehaltes sind aus Tab. 23 und Abb. 13 zu entnehmen.

Tabelle 23: Leberfettgehalt in % Trockengewicht
Versuchsreihe III

Gruppe	Lipide in % Trockengewicht
1 Casein	8,2 % s = $\pm$ 0,7
2 Cas.+Gluk.erh.*	15,5 % s = $\pm$ 8,3
3 Cas.+Gluk.erh.* Lys, Met, Try	39,5 % s = $\pm$ 14,8
4 Casein+5 % Cas.+Gluk.erh.**	10,0 % s = $\pm$ 1,8

*) = 120 min 140° C

**) = 5 Std 140° C

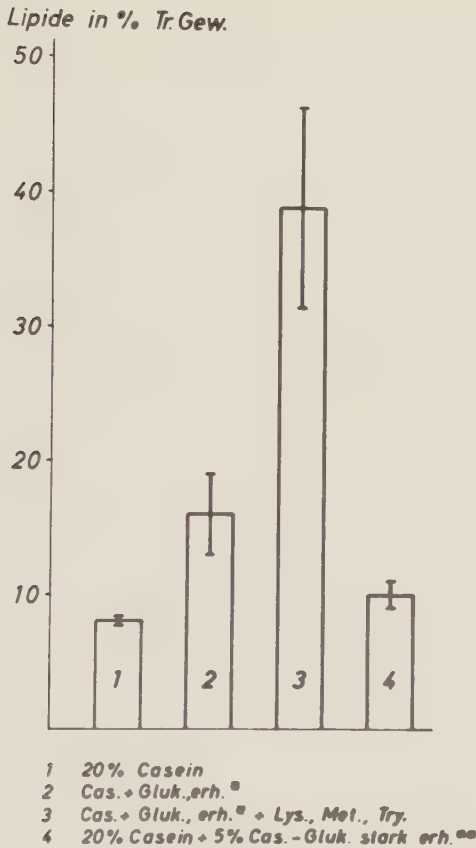


Abb. 13: Leberfettgehalt in % Trockengewicht
Versuchsreihe III

* 120 min 140° C

** 5 Std 140° C

Die statistische Auswertung nach der Varianzanalyse ergab hochsignifikante Unterschiede ($P \ll 0,01$) zwischen

Gruppe 1 —→ Gruppe 3

Gruppe 2 —→ Gruppe 3

Gruppe 3 —→ Gruppe 4

Die Verfütterung der MAILLARD-Produkte führte zu einer deutlichen Erhöhung der Fetteinlagerung. Die Zulage von 5% einer sehr stark erhitzten Casein-Glukose-Mischung (5 Std. 140° C) hatte dagegen nur einen sehr geringen Einfluß auf die Lipideinlagerung in der Leber, der statistisch nicht signifikant war. Daraus ist zu schließen, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen keine direkte hepatotoxische Wirkung des Bräunungsproduktes vorliegt.

Zulagen der Aminosäuren, denen eine lipotrope Wirkung in der Literatur zugeschrieben wird - Met, Thr, Try - verbesserten zwar das Wachstum, die Futteraufnahme sowie die "Protein-Efficiency Ratio", erhöhten jedoch entgegen der Erwartung den Leberfettgehalt erheblich, anstatt ihn zu senken. Diese Beobachtung läßt auf das Vorliegen bzw. die Verstärkung einer Aminosäure-Imbalanz schließen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Ergebnisse der III. Versuchsreihe überprüft. Gleichzeitig sollte durch Variation des Methionin-Anteils im Mengenbereich üblicher Anreicherungsverfahren die lipotrope Wirkung dieser Aminosäure untersucht werden. In einer Versuchsgruppe wurde die Aminosäure Threonin zusätzlich zugelegt. Die Ergebnisse sind aus Tab. 24 und Abb. 14 ersichtlich.

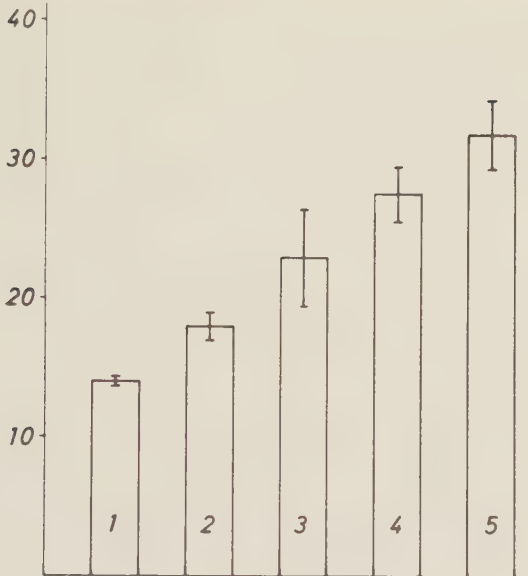
Tabelle 24: Leberfettgehalt in % Trockengewicht
Versuchsreihe IV

Gruppe	Lipide in % Trockengewicht
1 Casein	14,1 % s = $\pm$ 0,6
2 Cas.+Gluk.erh.*	17,9 % s = $\pm$ 1,9
3 Cas.+Gluk.erh.* +Lys,Met ^{d)} ,Try	22,6 % s = $\pm$ 6,6
4 Cas.+Gluk.erh.* +Lys,Met,Try	27,8 % s = $\pm$ 4,1
5 Cas.+Gluk.erh.* -Lys,Met ^{d)} ,Thr,Try	32,9 % s = $\pm$ 4,9

* 90 min auf 140° C

d) = doppelte Menge gegenüber Gruppe 3 /Versuchsreihe III

Lipide in % Tr. Gew.



1 20% Casein

2 20% Cas. + Gluk. erh.*

3 20% Cas. + Gluk. erh.* + Lys., Met. d), Try.

4 20% Cas. + Gluk. erh.* + Lys., Met., Try

5 20% Cas. + Gluk. erh.* + Lys., Met. d), Thr., Try.

Abb. 14: Leberfettgehalt in % Trockengewicht

Versuchsreihe IV

* 90 min auf 140° C

d) = doppelte Menge gegenüber Gruppe 3

In Versuchsreihe IV lag der Fettgehalt der Leber in Gruppe 2 höher als bei der Kontrollgruppe. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Die statistische Auswertung zeigte folgendes Bild:

($P \ll 0,05$) Gruppe 1 → Gruppe 4

Gruppe 1 → Gruppe 5

($P \ll 0,05$) Gruppe 2 → Gruppe 4

Gruppe 3 → Gruppe 5

Hochsignifikante Unterschiede waren zwischen der Kontrollgruppe sowie Gruppe 4 und 5, außerdem zwischen Gruppe 2 und 5 festzustellen.

Die Ergebnisse des Versuchs bestätigten die Ergebnisse der III. Versuchsreihe. Zulagen "lipotroper" Aminosäuren in Konzentrationen, die bei der Anreicherung von Proteinen üblich sind, erhöhten die Fetteinlagerung in der Leber der Versuchstiere.

Der Zusatz von Threonin hatte, im Gegensatz zu Erfahrungen anderer Autoren bei niedriger Proteinzufuhr (1,12 % Stickstoff, OGURA et al. 1963), bei einem Proteingehalt von 18% keine lipotrope Wirkung, sondern erhöhte den Leberfettgehalt signifikant gegenüber Gruppe 3, die nur Methionin-, Lysin- und Tryptophanzulagen erhielt.

Durch Methioninzugabe kann nach Angabe verschiedener Autoren bei Cholinmangel Fettleber verhindert werden (TUCKER et al. 1937, CHANNON et al. 1938, BEST et al. 1940, SINGAL et al. 1939). Weitere Versuche zeigten, daß Methionin bei ausgewachsenen Ratten als lipotroper Faktor wirkungsvoller ist als bei jungen Ratten und ebenso weniger effektiv bei hohem Proteingehalt als bei niedrigem (TREADWELL et al. 1942, HORNING und ECKSTEIN 1944). Bei erhöhtem Bedarf von Aminosäuren für die Proteinsynthese ist die lipotrope Wirkung von Methionin offenbar vermindert. Bei 9%iger Casein-Kost wurde durch Methioninzulage ein antilipotroper Effekt erzielt, der durch Threoninzugaben wieder verringert werden konnte (SINGAL et al. 1953, HARPER et al. 1953).

Die Ergebnisse der Versuchsreihe IV zeigen, daß durch Methionin unter den gewählten Versuchsbedingungen ebenfalls ein antilipotroper Effekt erzielt wird, der jedoch durch Zulagen von Threonin nicht vermindert, sondern verstärkt wird. Zulagen der Aminosäuren Thr und Lys in den gewählten Konzentrationen erwiesen sich in Bezug auf die Fetteinlagerung in der Leber als wirkungslos.

Das Ziel einer weiteren Versuchsreihe bestand darin, bei optimaler Aufwertung eines durch MAILLARD-Reaktion geschädigten Proteins eine Herabsetzung der Fetteinlagerung in der Leber der Versuchstiere zu erreichen. Auf Grund von Ergebnissen der enzymatischen Hydrolyse der MAILLARD-Produkte im Vergleich zu nicht erhitztem Casein (s. 4.1.2) sowie der Ergebnisse von Plasma-Aminosäure-Analysen (s. 4.2.6) wurde

neben einer Wiederholung der Versuchsgruppen 1 - 3 der Versuchsreihe IV eine zusätzliche Anreicherung mit Arginin vorgenommen (Gruppe 4). In einer weiteren Versuchsgruppe erfolgte die Anreicherung mit Aminosäuren nach Art und Menge nur auf Grund des Vergleichs der Aminosäurefreisetzung in den enzymatischen Hydrolysaten. Über die Ergebnisse orientieren Tab. 25 und Abb. 15.

Tabelle 25: Leberfettgehalt in % Trockengewicht
Versuchsreihe V

Gruppe	Lipide in % Trockengewicht
1 Casein	7,2 % s = $\pm$ 1,8
2 Cas.+Gluk.erh.*	16,3 % s = $\pm$ 10,7
3 Cas.+Gluk.erh.*+Lys, Met ^d , Thr, Try	26,5 % s = $\pm$ 17,2
4 Cas.+Gluk.erh.*+Arg, Lys, Met ^d , Thr, Try	8,2 % s = $\pm$ 1,8
5 Cas.+Gluk.erh.*+Arg, His, Lys, Met, Try	9,2 % s = $\pm$ 1,3

* 90 min auf 140° C

d) doppelte Menge gegenüber Gruppe 3/ Versuchsreihe III

In Versuchsreihe V ergaben sich aus der statistischen Auswertung folgende Unterschiede:

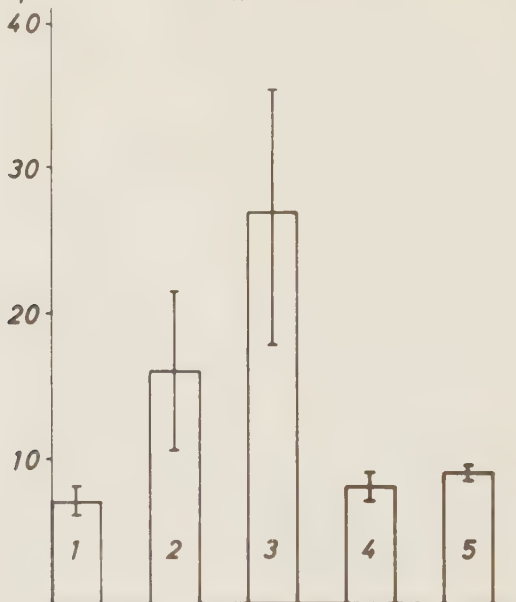
(P < 0,01) Gruppe 1 → Gruppe 2 Gruppe 2 → Gruppe 3
 Gruppe 1 → Gruppe 3 Gruppe 2 → Gruppe 4
 Gruppe 2 → Gruppe 5

Zwischen den Gruppen 1 und 4, 1 und 5 sowie 4 und 5 waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Die Zulage von Arginin in Gruppe 4 führte zu einer ein-drucksvollen Verminderung der Lipideinlagerung in der Leber, so daß kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe bestand, desgleichen bei der Aminosäurezulage in Gruppe 5.

Die Ergebnisse dieser Gruppe sind ferner eine Bestätigung der Möglichkeit, die Analysenwerte der enzymatischen Hydrolyse in vitro auf in vivo-Versuche zu übertragen und Ände-

rungen der Proteinwertigkeit zu erfassen bzw. gezielt auszugleichen. *Lipide in % Tr. Gew.*



- 1 20 % Casein
- 2 20 % Cas. + Gluk. erh.[■]
- 3 20 % Cas. + Gluk. erh.[■] + Lys., Met.^{d)}, Thr., Try.
- 4 20 % Cas. + Gluk. erh.[■] + Arg., Lys., Met.^{d)}, Thr., Try.
- 5 20 % Cas. + Gluk. erh.[■] + Arg., His., Lys., Met., Try.

Abb. 15: Leberfettgehalt in % Trockengewicht

Versuchsreihe V

* 90 min auf 140° C

d) doppelte Menge gegenüber Gruppe 3/ Versuchsreihe III

Abb. 16, in der die Ergebnisse der Versuchsreihen IV und V zusammengefaßt dargestellt sind, zeigt, daß durch die MAILLARD-Reaktion des Futterproteins mit Glukose der Leberfettgehalt damit gefütterter Tiere von 100 (= Kontrolle) prozentual auf 170 anstieg. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich in einer verringerten Verfügbarkeit der Aminosäuren und einer hierdurch herbeigeführten Aminosäure-Imbalanz oder einer Unterversorgung mit bestimmten essentiellen Aminosäuren zu suchen. Ein zusätzlicher hepatotoxischer Effekt von Reaktionsprodukten der Bräunungsreaktion

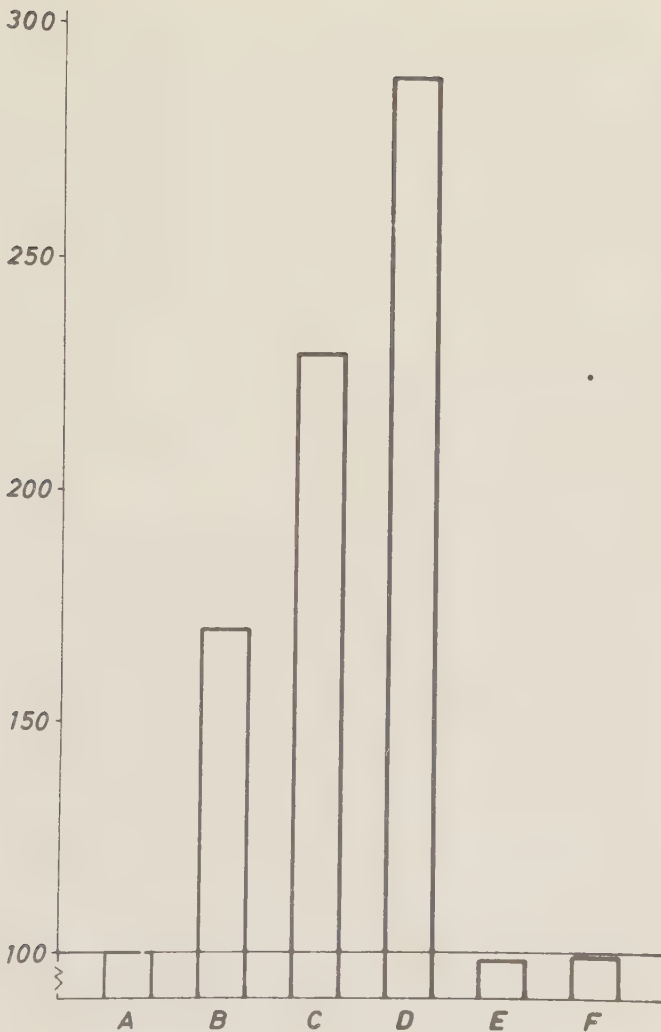


Abb. 16: Vergleich des Fettgehaltes der Leber in einer Zusammenfassung der Versuchsreihen IV und V, bezogen auf den Fettgehalt bei den Tieren der Kontrollgruppe = 100

A = 20% Casein

B = Cas.+Gluk.erh., 90 min 140°C

C = Cas.+Gluk.erh.+ Lys, Met, Try

D = Cas.+Gluk.erh.+Lys, Met, Thr, Try

E = Cas.+Gluk.erh.+Arg, Lys, Met, Thr, Try

F = Cas.+Gluk.erh.+Arg, His, Lys, Met, Try

ist nicht völlig auszuschließen.

Zulagen von L-Methionin, L-Lysin sowie L-Tryptophan zum Futterprotein setzten die Fetteinlagerung nicht herab, sondern erhöhten sie auf 230 gegenüber der Kontrolle (C). Durch Threoninzulage (D) steigt der Fettgehalt der Leber weiter an auf 290 gegenüber der Kontrolle. Nach diesem Ergebnis liegt kein durch Methioninzugabe hervorgerufener Threoninmangel und damit keine Threoninmangel-Fettleber vor wie bei OGURA et al. (1968) und WILFRED und SEKHARA VARMA (1969). Erst eine Zulage von 0,3% L-Arginin, die außer den vorher genannten Aminosäuren gegeben wurde (E und F), senkte die Lipideinlagerung auf die Werte der Kontrolltiere. Arginin, eine für die junge Ratte essentielle Aminosäure, war offensichtlich infolge der MAILLARD-Reaktion nicht mehr ausreichend verfügbar. Die zusätzlichen Gaben der übrigen Aminosäuren können den Argininmangel verstärkt haben, wodurch eine "Argininmangel-Fettleber" auftrat.

Über die Bedeutung von Arginin für die wachsende Ratte war bereits 1946 von BORMAN et al. berichtet worden. KOFRÁNYI et al. (1969) stellten in Versuchen an Menschen bei Fehlen von Arginin und Histidin in einer die acht essentiellen Aminosäuren enthaltenden Kost einen starken Anstieg der Alanin-Transaminase- sowie der Aspartat-Transaminase-Aktivität im Serum fest. Diese führen die Autoren auf eine Leberschädigung zurück. Nach Zulage von Arginin und Histidin blieb der Anstieg der Transaminase-Aktivitäten aus.

Die Ursachen, die einerseits zur Fettinfiltration und andererseits zur Verringerung der Lipideinlagerung führen, sind bisher weitgehend ungeklärt. Jede metabolische Funktion wie Fettsynthese, Fettoxydation oder Fett-Transport kann beeinflusst sein, da sowohl die Synthese von Proteinen, einschließlich der Enzyme, Hormone als auch die der Lipoproteine von einer adäquaten Aminosäurezufuhr abhängig ist. Nach YOSHIDA und HARPER (1960) ist eine verminderte Fettoxydation als Ursache für eine erhöhte Lipideinlagerung bei Aminosäure-Imbalanz nicht auszuschließen. Weitere Ursachen können in einer erhöhten Lipidsynthese (WILFRED und SEKHARA VARMA 1969) sowie in einer Störung der Biosynthese und des

Katabolismus von Cholesterin liegen (VIVIANI und SECHI 1963). Bisher konnten keine Zusammenhänge zwischen den auftretenden Stoffwechselstörungen und der Entwicklung von Fettleber als Folge von Aminosäure-Imbalanz biochemisch geklärt werden. Zur Klärung der biochemischen Zusammenhänge sind daher weitere Versuche unter Berücksichtigung des Argininstoffwechsels erforderlich, wobei in Anlehnung an die Ergebnisse von KOFRÁNYI et al. der Aktivität der Transaminasen besondere Bedeutung zukommen dürfte.

4.2.5 Histologisch nachweisbare Veränderungen an der Leber

Die Fettleber ist ein häufiges und bisher nur ungenügend geklärtes Phänomen der menschlichen und tierischen Pathologie. Vor allem ist meist die Frage nicht eindeutig zu beantworten, ob es sich lediglich um eine jederzeit reversible Erscheinung handelt oder um ein irreversibles pathologisches Symptom. In jedem Falle ist eine erhöhte Fetteinlagerung nicht mehr als "physiologisch" zu betrachten, sondern als ein Anzeichen für Stoffwechselstörungen verschiedenster Ursachen. Neben der Bestimmung des Fettgehaltes der Leber auf chemischem Wege ist ein unentbehrliches Hilfsmittel zur Beurteilung jeder Art von Fettleber, vor allem zur Beurteilung ihres Schweregrades, die histopathologische Untersuchung. Es muß geprüft werden, welche morphologischen Kriterien, welche histologischen und cellulären Merkmale in einer verfetteten Leber anzutreffen sind. Aus diesem Grunde wurden in allen Versuchsreihen, neben der Bestimmung des Fettgehaltes der Leber, histologische Untersuchungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Ito, Dozentin für Ernährungspathologie in Osaka (Japan).

Grundsätzlich wird bei der morphologischen Betrachtung von Fetteinlagerungen in der Leber unterschieden zwischen zentralen, peripheren (periportalen) und diffusen Verfettungen.

Nach DAHME und WEISS (1968) sind zentrale Lipideinlagerungen auf Hypoxien, besonders Hypoxämien sowie chronische Ernährungsstörungen im Sinne von Mangelsyndromen zurückzuführen. Das bedeutet, daß der Sauerstoffverbrauch in der Längs-

chenperipherie in so hohem Maße gesteigert ist, daß das Läppchenzentrum unter Hypoxie leidet. Periphere Verfettungen sind im Gegensatz zur zentralen meist unmittelbare Folgen einer hämatogen einwirkenden Noxe. Da die Zellen der Peripherie zuerst mit dem arteriellen und portalen Blut in Berührung kommen, zeigen diese auch als erste Verfettungserscheinungen.

NINO-HERRERA et al. (1954), WILFRED und SEKHARA VARMA (1969) und PORTA et al. (1970) stellten bei Aminosäure- bzw. Threonin- sowie Proteinmangel immer periportale (= periphere) Verfettungen an Ratten fest. Dagegen trat nach Cholinmangel zentrolobuläre (= zentrale) Lipideinlagerung ein (NINO-HERRERA et al. 1954).

Die in der histologischen Auswertung der Versuchsreihen I bis V gefundenen Ergebnisse zeigen in den Kontrollgruppen keine histologisch darstellbaren Fetteinlagerungen (Abb. 17 und 18). Es war weder mit "Oil red-O" Fett darstellbar, noch zeigten sich im HE-Präparat Fett-Tropfen als Vakuolen.

Bei den Gruppen, die MAILLARD-Produkte erhielten, war in allen Versuchsreihen eine mittelgradige Verfettung nachweisbar (Abb. 19). In einigen Präparaten waren in den Kupfer'schen Sternzellen Fett-Tropfen gespeichert.

Nach Zulagen von Lys, Met und Try zu MAILLARD-Produkten (Versuchsreihe III, Gruppe 3) war eine zentrale Lipideinlagerung zu beobachten (Abb. 20 u. 21).

In der Versuchsreihe IV, Gruppe 4 (Verdoppelung der Methioninmenge gegenüber III/3) zeigte sich eine periphere Verfettung mit größeren Fett-Tropfen als in den übrigen Gruppen (Abb. 22). In der Versuchsreihe IV, Gruppe 5 (wie IV/4 mit Zusatz von Thr) lag eine periphere bis zum Zentrum reichende Verfettung vor (Abb. 23). Die Ergebnisse der Versuchsreihe V/1, V/2 und V/3 stimmten mit den entsprechenden der Versuchsreihe IV überein. In der Gruppe 4 und 5 (mit Arginin) waren jedoch Fetteinlagerungen histologisch nicht mehr nachweisbar. Damit wird das Ergebnis der chemischen Analyse bestätigt.

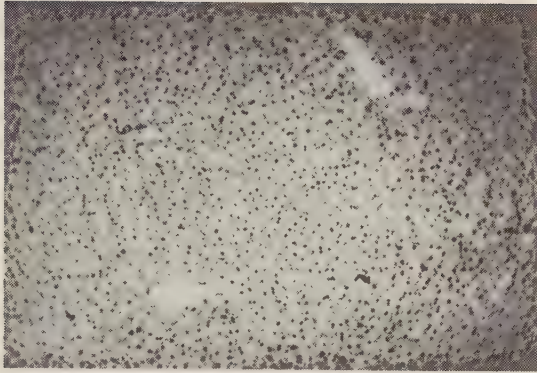


Abb. 17: Kontrolle 20% Casein. Keine mit Oil red-O darstellbaren Fetteinlagerungen. Hämalaun-Kernfärbung. x 40

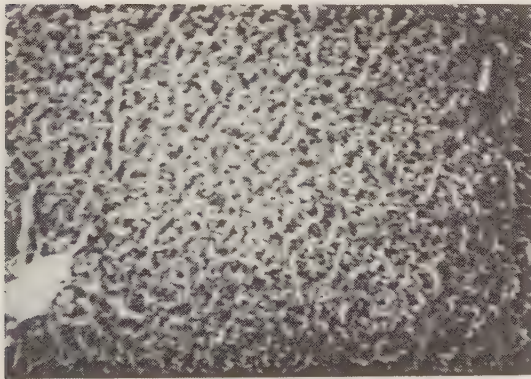


Abb. 18: Kontrolle 20% Casein. HE-Präparat - keine Fett-Tropfen als Vakuolen sichtbar. x 40

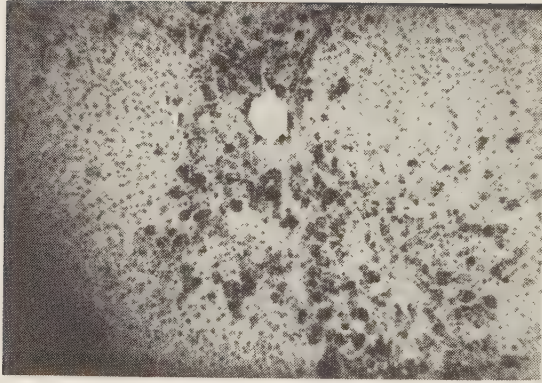


Abb. 19: Versuchsreihe III, Gruppe 2 (Cas.+Gluk.erh.).
Mittelgradige, periphere Verfettung mit Oil red-O
gefärbt. x 40

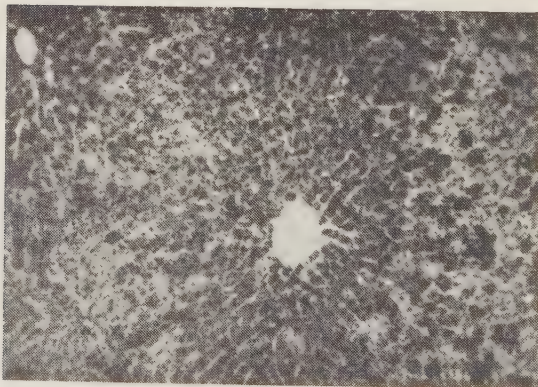


Abb. 20: Versuchsreihe IV, Gruppe 3 (Cas.+Gluk.erh.+Lys,
Met, Try). Zentrale Verfettung mit Oil red-O
gefärbt. x 40

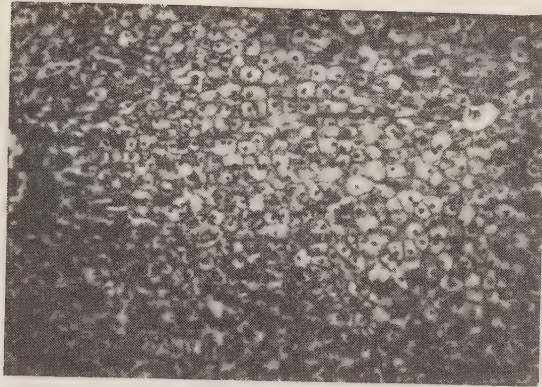


Abb. 21: Versuchsreihe III, Gruppe 3. HE-Präparat Fetteinlagerungen als Vakuolen sichtbar - zentrale Form

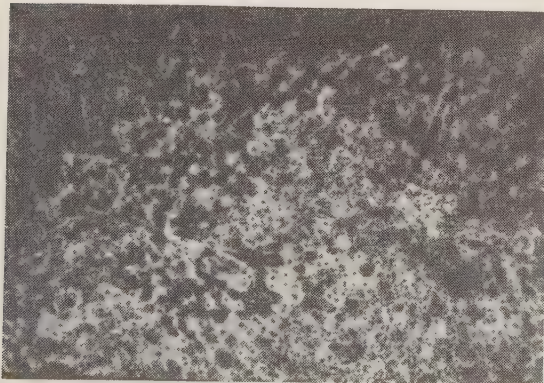


Abb. 22: Versuchsreihe IV, Gruppe 4 (Cas.+Gluk.erh.+ Lys, Met, Try). Periphere, großtropfige Verfettung mit Oil red-O gefärbt. x 40

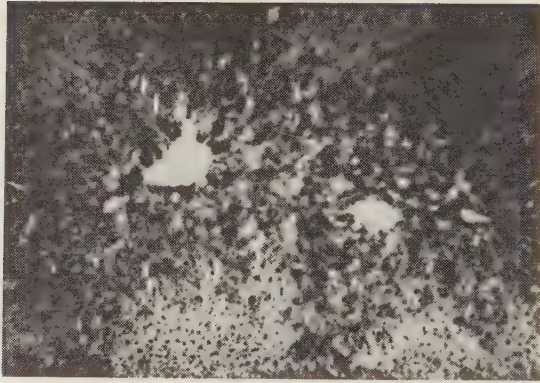


Abb. 23: Versuchsreihe IV, Gruppe 5 (Cas.+Gluk.erh.+Lys, Met^d), Thr, Try). Periphere bis zum Zentrum reichende Verfettung mit Oil red-O gefärbt. x 40

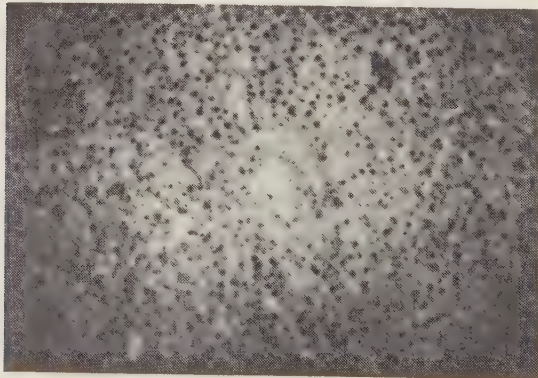


Abb. 24: Versuchsreihe V, Gruppe 5 (Cas.+Gluk.erh.+ Arg, His, Lys, Met, Try). Keine mit Oil red-O darstellbaren Fetteinlagerungen. Hämalan-Kernfärbung. x 40

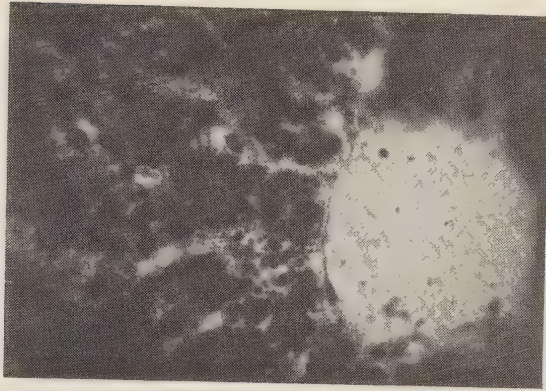


Abb. 25: Versuchsreihe V, Gruppe 3 (Cas.+Gluk.erh.+ Lys, Met^d), Thr, Try). Periphere bis zum Zentrum reichende starke Verfettung mit Oil red-O.

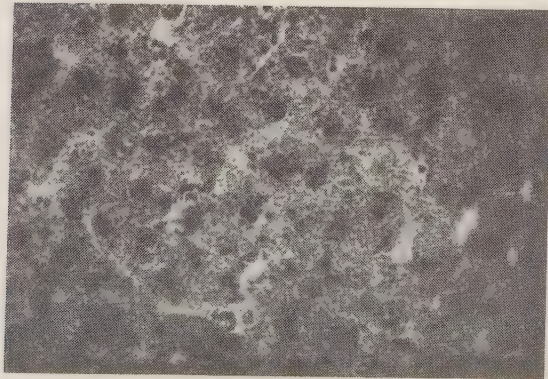


Abb. 26: Versuchsreihe V, Gruppe 4 (Cas.-Gluk.erh.-Arg, Lys, Met^d), Thr, Try). Keine mit Oil red-O darstellbaren Fetteinlagerungen. Kernfärbung mit Hämalaun.

4.2.6 Veränderungen der Plasma-Aminosäuren

Es ist bekannt, daß Aminosäure-Imbalancen bei der Protein-zufuhr die Plasma-Aminosäurekonzentration bei Ratten verändert (HARPER und ROGERS 1965). So fanden u.a. KUMTA und HARPER (1962) eine Verminderung von Histidin im Plasma von Ratten mit Histidin-freier Kost.

MORRISON et al. (1961) stellten in ihren Versuchen fest, daß Lysin bei einer Lysin-Mangelkost im Plasma einen niedrigen Spiegel aufweist, jedoch rapide ansteigt, wenn der Gehalt im Futter über dem liegt, der für eine Erhöhung des Körpergewichtes nötig ist.

In weiteren Versuchen zeigten McLAUGHLAN und ILLMAN (1967), daß eine lineare Beziehung zwischen freiem Lysin im Plasma und der Höhe des mit der Nahrung zugeführten Lysin besteht. Zu den gleichen Ergebnissen kamen STOCKLAND et al. (1970). Nach ANDERSON et al. (1969) sind Änderungen der Plasma-Aminosäurekonzentration abhängig von der Menge und Zusammensetzung der aufgenommenen Aminosäuren, der Möglichkeit der Ausnutzung der Aminosäuren für die Proteinsynthese sowie der Fähigkeit, den Überschuß abzubauen. Die Plasma-Aminosäurekonzentration wurde daher als weiteres Kriterium in die Untersuchungen einbezogen.

Die Plasma-Aminosäure-Analysen der Versuchsreihen IV und V ergaben, daß der Gehalt an freien Aminosäuren bei den Gruppen mit MAILLARD-Produkten (IV/2 und V/2) gegenüber den Kontrollgruppen allgemein vermindert war. Besonders stark erniedrigt war der Gehalt an Lysin, aber auch an Arginin und weiteren Aminosäuren (Tab. 26 u. 27). Zulagen von Lysin, Methionin und Tryptophan (IV/3) bewirkten eine erhebliche Erhöhung der Plasma-Aminosäurekonzentration für alle Aminosäuren (Tab. 26), jedoch lag der Lysinspiegel weiterhin unter dem der Kontrolle. Lysin-, Methionin-, Threonin- und Tryptophan-Zulagen (IV/5 und V/3) waren ohne statistisch sicherbaren Effekt, ausgenommen eine Erhöhung des Lysinspiegels.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß in allen Gruppen, die MAILLARD-Produkte ohne Zusatz von Aminosäuren erhielten, eine Aminosäure-Imbalanz auftritt, die zu einer unterschied-

Tabelle 26: Plasma-Aminosäurezusammensetzung in $\mu\text{mol}/100 \text{ ml}$ Plasma

Versuchsreihe IV

AS	Gruppen				
	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	4 ⁺	5 ⁺
Asp	1,6 $\pm$ 0,2 ^{s)}	0,9 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,2
Thr	17,2 $\pm$ 0,9	8,2 $\pm$ 0,2	11,1 $\pm$ 1,5	12,0 $\pm$ 4,3	8,4 $\pm$ 0,4
Ser	6,3 $\pm$ 0,5	3,6 $\pm$ 0,1	5,2 $\pm$ 0,8	6,1 $\pm$ 2,0	4,6 $\pm$ 1,0
Glu	15,7 $\pm$ 0,8	9,4 $\pm$ 1,2	18,4 $\pm$ 1,8	20,2 $\pm$ 5,6	12,2 $\pm$ 1,1
Pro	13,2 $\pm$ 1,1	6,7 $\pm$ 0,6	7,2 $\pm$ 2,0	7,6 $\pm$ 2,2	4,4 $\pm$ 0,9
Gly	5,3 $\pm$ 0,8	3,5 $\pm$ 0,5	4,4 $\pm$ 0,6	5,9 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 1,6
Ala	16,9 $\pm$ 1,4	7,7 $\pm$ 0,6	11,7 $\pm$ 1,5	11,3 $\pm$ 2,6	10,0 $\pm$ 2,4
Val	11,8 $\pm$ 0,0	5,9 $\pm$ 0,7	8,8 $\pm$ 1,9	9,5 $\pm$ 3,4	7,3 $\pm$ 0,5
Met	1,8 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,4
Iso	3,6 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,9	2,3 $\pm$ 0,4
Leu	5,7 $\pm$ 0,7	2,2 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 1,0	4,2 $\pm$ 0,0	3,8 $\pm$ 0,4
Tyr	3,7 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,3
Phe	1,9 $\pm$ 0,1	---	0,8 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,3
NH ₃	18,9 $\pm$ 2,5	15,0 $\pm$ 1,3	15,9 $\pm$ 0,7	19,1 $\pm$ 3,5	17,0 $\pm$ 1,7
His	1,8 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,7	1,9 $\pm$ 0,5
Lys	17,8 $\pm$ 1,4	2,5 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 1,4	7,7 $\pm$ 3,9	12,0 $\pm$ 1,6
Orn	2,6 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,5	2,6 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 1,3	2,0 $\pm$ 0,5
Arg	2,9 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 0,7	1,9 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 0,8

s) = Standardabweichung

+) = 1 = 20% Casein

= 2 = Cas.+Gluk.erh. (90 min auf 140°C)

= 3 = Cas.+Gluk.erh.+Lys, Met^{d)}, Try

= 4 = Cas.+Gluk.erh.+Lys, Met, Try

= 5 = Cas.+Gluk.erh.+Lys, Met^{d)}, Thr, Try

d) = doppelte Menge gegenüber Gruppe 3/Versuchsreihe III

Tabelle 27: Plasma-Aminosäurezusammensetzung in $\mu\text{mol}/100 \text{ ml}$ Plasma

Versuchsreihe V

AS	Gruppen				
	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	4 ⁺	5 ⁺
Asp	0,7 $\pm$ 0,2 ^{s)}	0,8 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1
Thr	16,7 $\pm$ 1,5	18,1 $\pm$ 2,7	22,3 $\pm$ 1,4	20,4 $\pm$ 2,8	16,7 $\pm$ 1,6
Ser	5,4 $\pm$ 0,6	7,8 $\pm$ 1,1	7,1 $\pm$ 0,6	6,1 $\pm$ 0,5	5,9 $\pm$ 0,6
Glu	10,0 $\pm$ 1,5	11,1 $\pm$ 3,3	11,3 $\pm$ 1,5	9,5 $\pm$ 0,9	7,8 $\pm$ 0,6
Pro	12,3 $\pm$ 2,0	10,1 $\pm$ 3,1	8,8 $\pm$ 1,8	7,6 $\pm$ 0,4	5,4 $\pm$ 1,9
Gly	4,4 $\pm$ 0,9	4,3 $\pm$ 0,6	3,5 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,8	5,0 $\pm$ 0,8
Ala	13,8 $\pm$ 1,0	13,6 $\pm$ 2,6	14,8 $\pm$ 0,6	14,1 $\pm$ 1,2	14,2 $\pm$ 3,1
Val	6,7 $\pm$ 0,7	6,9 $\pm$ 1,4	8,5 $\pm$ 0,3	7,6 $\pm$ 0,6	6,6 $\pm$ 0,8
Met	1,6 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,7	2,9 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,3
Iso	3,0 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,5	3,6 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,5
Leu	5,0 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,8	5,9 $\pm$ 0,6	5,3 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,5
Tyr	3,0 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,7	2,2 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,3
Phe	2,0 $\pm$ 0,9	1,6 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,0
NH ₃	7,6 $\pm$ 1,0	11,3 $\pm$ 1,8	10,8 $\pm$ 0,8	8,5 $\pm$ 0,8	7,3 $\pm$ 1,6
His	1,5 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,2
Lys	14,6 $\pm$ 1,9	3,9 $\pm$ 1,3	10,5 $\pm$ 0,6	10,9 $\pm$ 2,2	13,1 $\pm$ 2,1
Orn	1,9 $\pm$ 1,2	1,5 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,5
Arg	2,5 $\pm$ 1,2	1,6 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,3
Tau	11,5 $\pm$ 1,9	15,5 $\pm$ 2,1	8,3 $\pm$ 1,0	23,4 $\pm$ 2,5	---
Try	1,4 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,3

s) = Standardabweichung

+) = 1 = 20% Casein

= 2 = Cas.+Gluk.erh. (90 min.auf 140°C)

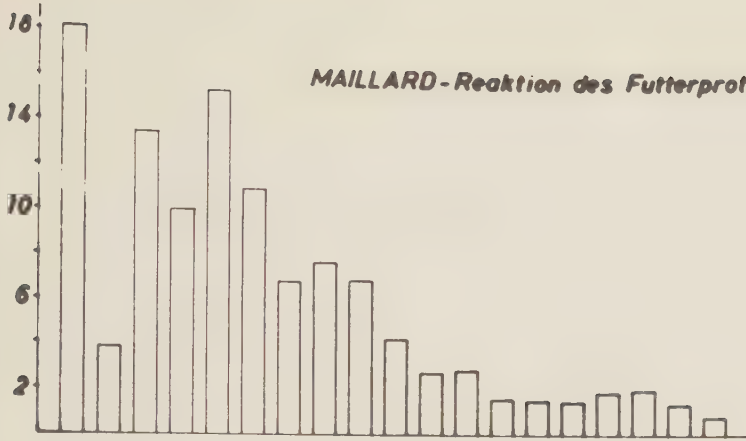
= 3 = Cas.+Gluk.erh.+Lys, Met^{d)}, Thr, Try

= 4 = Cas.+Gluk.erh.+Arg, Lys, Met^{d)}, Thr, Try

= 5 = Cas.+Gluk.erh.+Arg, His, Lys, Met, Try

d) = doppelte Menge gegenüber Gruppe 3/ Versuchsreihe III

MAILLARD-Reaktion des Futterproteins



Kontrollgruppe

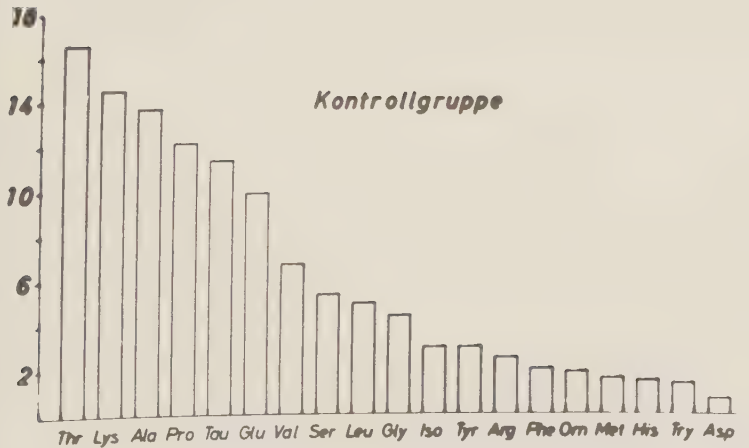


Abb. 27: Veränderung der Plasma-Aminosäurezusammensetzung bei Tieren, die MAILLARD-Produkte erhielten im Vergleich zur Kontrollgruppe.
Versuchsreihe V

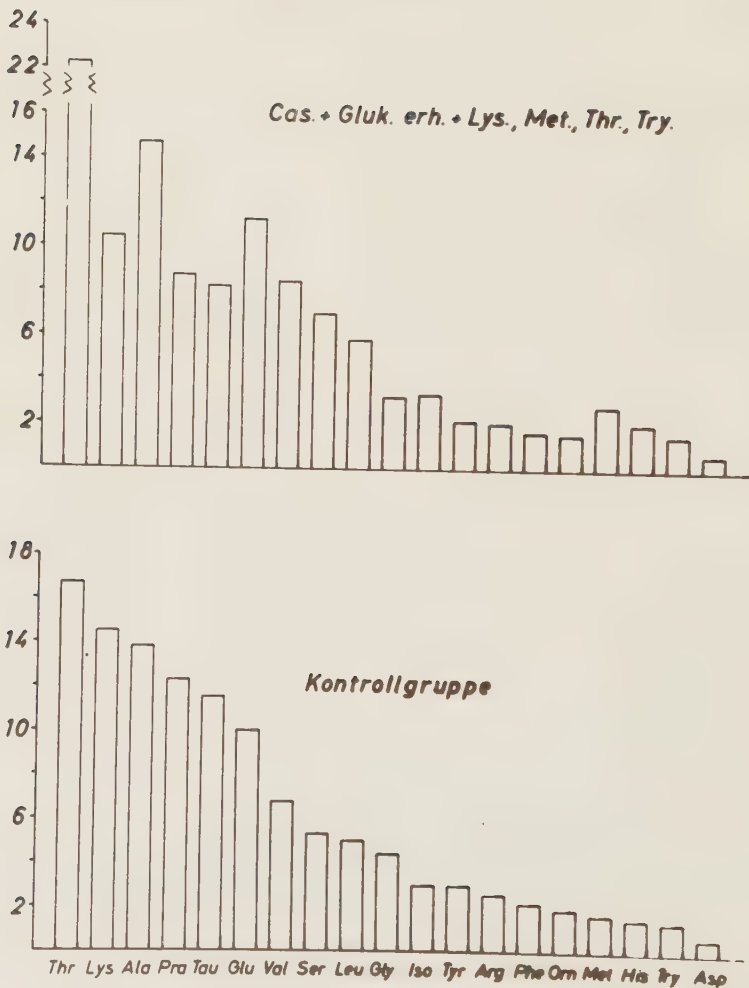


Abb. 28: Veränderung der Plasma-Aminosäurezusammensetzung bei Tieren mit Zulagen von Lys, Met, Thr und Try zu MAILLARD-Produkten gegenüber der Kontrollgruppe. Versuchsreihe V

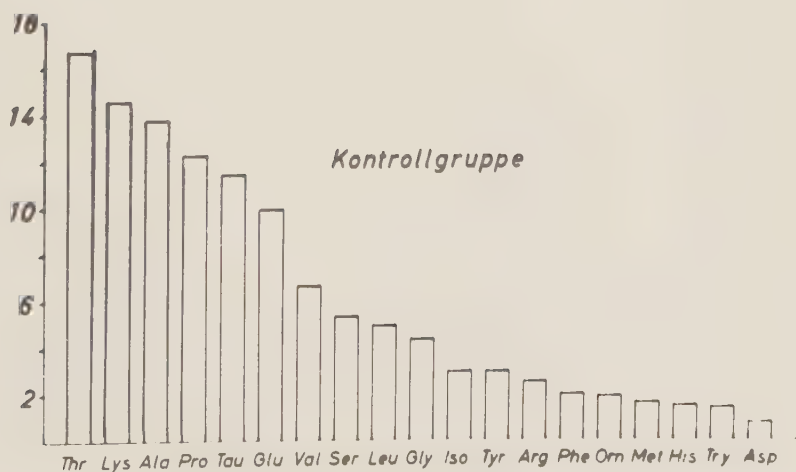
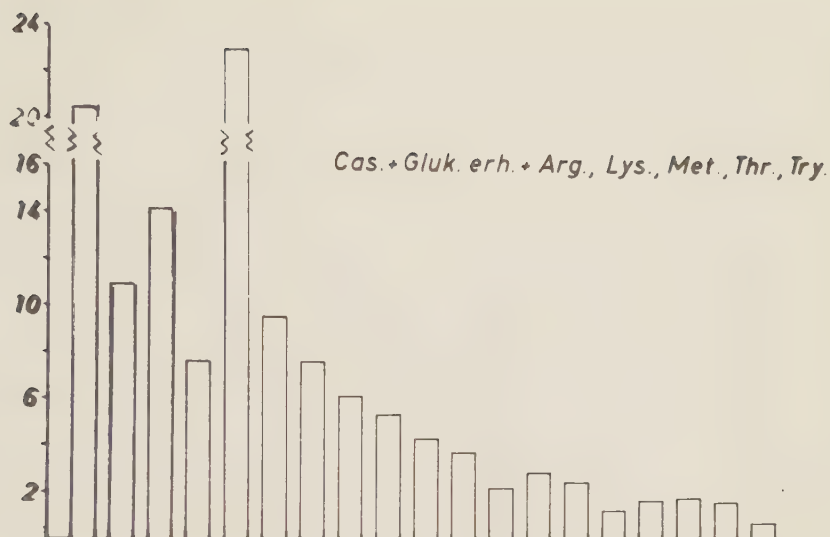


Abb. 29: Veränderung der Plasma-Aminosäurezusammensetzung bei Zulagen von Arg, Lys, Met und Try zu MAILLARD¹ Produkten im Vergleich zur Kontrollgruppe.
Versuchsreihe V

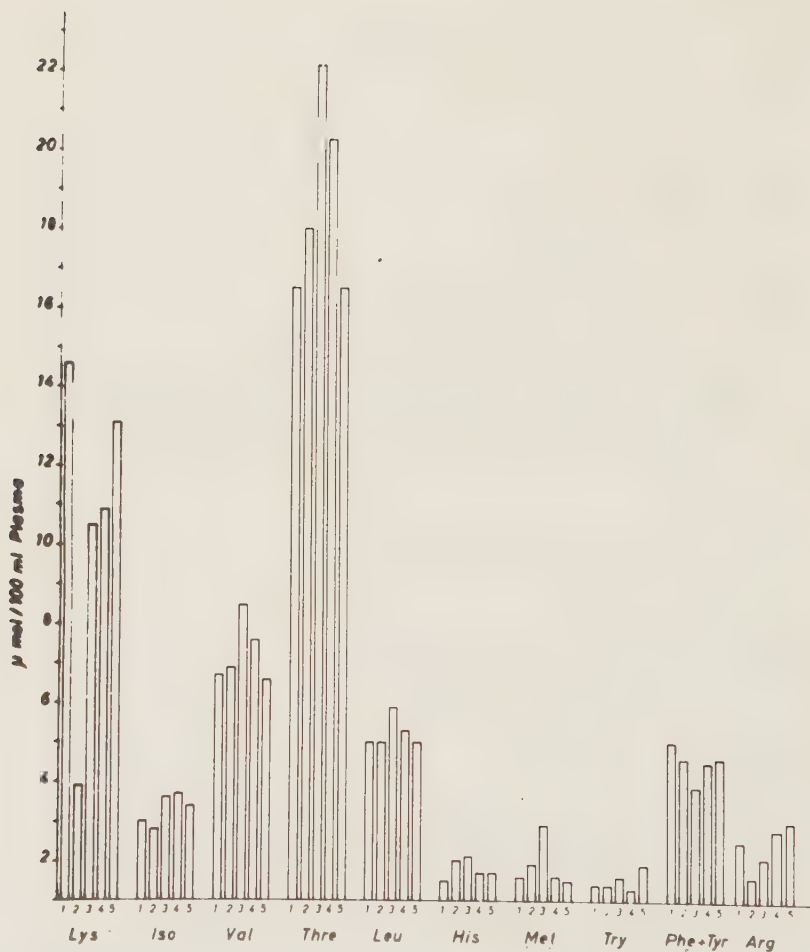


Abb. 30: Gehalt an essentiellen Aminosäuren im Plasma der Versuchsreihe V, Gruppe 1-5.

lichen Herabsetzung der Plasma-Aminosäurekonzentration führt. Wahrscheinlich entsteht ein Proteinmangel, der durch die Bildung enzymresistenter Bindungen und damit verminderte Resorption von Aminosäuren bedingt sein könnte, verstärkt durch die infolge der Aminosäure-Imbalanz bedingte verminderte Futteraufnahme.

Die Abbildungen 27 bis 30 verdeutlichen die Veränderungen des Plasma-Aminosäure-Spiegels im Vergleich aller Versuchsgruppen der Versuchsreihen IV und V. Ungewöhnlich erscheint der hohe Threoninspiegel. Bemerkenswert ist es zweifellos, daß Gruppe V/5, die eine Ergänzung entsprechend der enzymatischen Hydrolyse des Futters erhielt, als einzige einen Plasma-Lysingehalt aufweist, der nahezu in Höhe der Kontrollgruppe liegt. Dies ist bedingt durch die hohe Zulage von 1,2% Lysin. Der Arginin-Spiegel des Plasmas liegt **höher als der** der übrigen Gruppen.

Eine Erklärung für die Wirkung des Arginins ist aus dem Plasma-Aminosäure-Spiegel jedoch nicht abzuleiten, da die Unterschiede zu gering und statistisch nicht sicherbar sind.

5. Zusammenfassung

Die nichtenzymatische Bräunungsreaktion zwischen Proteinen und reduzierenden Zuckern (= MAILLARD-Reaktion) ist eine der verbreitetsten chemischen Reaktionen bei der Erhitzung von Lebensmitteln.

In Versuchen an wachsenden männlichen Wistar-Ratten wurde bei einem Proteingehalt des Futters von 18% als Auswirkung der Verfütterung von "MAILLARD"-Produkten die Entstehung einer Fettleber beobachtet. Die Charakterisierung dieser Fettleber, die Ermittlung ihrer Ursachen und die Möglichkeiten zur Vermeidung dieser alimentär bedingten erhöhten Lipideinlagerung in der Leber durch Zulagen verschiedener Aminosäuren war Zielsetzung dieser Arbeit.

Als Modellsubstanzen für "MAILLARD"-Produkte dienten Casein-Glukose-Mischungen, die für 60, 90, 120 und 300 min auf 140°C erhitzt worden waren. Diese Produkte wurden in insgesamt fünf Versuchsreihen im Vergleich zu nicht erhitzten Casein-Glukose-Mischungen, mit und ohne Zusatz verschiedener Aminosäuren, verfüttert. Futteraufnahme, Wachstum, PER, Leberfettgehalt sowie Veränderungen der freien Aminosäuren im Plasma dienten als Kriterien für die Auswirkung der "MAILLARD"-Reaktion.

Anhaltspunkte für Veränderungen der Proteinqualität durch MAILLARD-Reaktionen und hierdurch für eine gezielte Anreicherung mit bestimmten essentiellen Aminosäuren wurden durch säulenchromatographische Aminosäurebestimmungen in Säure- bzw. Alkalihydrolysaten sowie enzymatischen Hydrolysaten der Futterproteine gewonnen. Anhand dieser Daten und auf Grund von Literaturangaben über die lipotrope Wirkung von Aminosäuren erfolgten die Zulagen bei den verschiedenen Versuchsgruppen.

In allen Versuchsreihen zeigte die Gruppe, die "MAILLARD"-Produkte erhielt, erwartungsgemäß vermindertes Wachstum. Die stärkste Reduktion war nach Verfütterung des für 120 min auf 140°C erhitzten Casein-Glukosegemischs festzustellen (-76%). Die durchschnittliche Verminderung in den übrigen Versuchsreihen lag bei 54%. Der Futterverbrauch war

in diesen Gruppen ebenfalls in allen Versuchsreihen signifikant geringer als der Futterverbrauch der Kontrollgruppe. Die Protein Efficiency Ratio war erniedrigt. Die Lipideinlagerung in der Leber war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Alle Tiere zeigten mittelgradige periphere bis zum Läppchenzentrum reichende Verfettungen. Erniedrigt war der Plasma-Aminosäure-Spiegel, verglichen mit den freien Aminosäuren im Plasma der Kontrolltiere.

Die verminderte Körpergewichtszunahme bei der Verfütterung von "MAILLARD"-Produkten an wachsende Ratten hat im wesentlichen zwei Ursachen: verringerte Futteraufnahme und verminderte Verfügbarkeit von Aminosäuren infolge Blockierung der Verdaulichkeit durch Bildung enzymresistenter Bindungen. Beide Vorgänge führen zu einer Aminosäure-Imbalanz, die durch Aminosäurezulagen teilweise oder auch ganz (Versuchsreihe V, Gruppe 5) behoben werden kann. Eine zusätzliche hepatotoxische Wirkung der "MAILLARD"-Produkte konnte bei einer Zulage von 5% eines sehr stark erhitzten Casein-Glukose-Gemischs zur Kontrollkost nicht festgestellt werden (Versuchsreihe III, Gruppe 4), ist jedoch nicht völlig auszuschließen und sollte in weiteren Versuchsreihen mit niedrigem Proteinanteil in der Kost überprüft werden.

Zulagen von Lysin, Methionin, Threonin und Tryptophan verbesserten erwartungsgemäß Futteraufnahme, Wachstum und PER gegenüber den Gruppen, die nur "MAILLARD"-Produkte erhielten, setzten jedoch gleichzeitig entgegen der Erwartung die Lipideinlagerung in der Leber nicht herab, sondern erhöhten sie bis auf etwa 40%. Die Tiere zeigten starke periphere bis zum Läppchenzentrum reichende Verfettungen. Der Plasma-Aminosäure-Spiegel lag weiterhin unter dem der Kontrollgruppe. Erst durch eine zusätzliche Arginingabe zu den übrigen Aminosäuren konnte der Leberlipidgehalt auf Normalwerte (9-12%) gesenkt werden. Er entspricht jetzt dem der Kontrollgruppe.

Arginin ist für die wachsende Ratte eine essentielle Aminosäure, da ihre Syntheserate meist nicht zur Bedarfsdeckung ausreicht. Argininzulagen bewirken eine erhebliche Verbesserung des Wachstums. Auf Grund der Ergebnisse der enzyma-

tischen Hydrolyse der Futterproteine ist anzunehmen, daß neben der Lysin-Unterversorgung ein Arginin-Mangel bei den Ratten vorlag, der zu einem erhöhten Leberfettgehalt führte. Die Beeinträchtigung der Argininzufuhr und damit des Argininstoffwechsels durch eine "MAILLARD"-Reaktion des Futterproteins, verbunden mit einer erhöhten Fetteinlagerung in der Leber wachsender Versuchstiere, war bisher nicht bekannt bzw. im Tierversuch noch nicht nachgewiesen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ist zu schließen, daß die nach Verfütterung von MAILLARD-Produkten auftretende Fettleber vorwiegend die Folge von Aminosäure-Imbalancen infolge von Veränderungen der Verfügbarkeit der Aminosäuren Lysin und Arginin ist.

Die Anreicherung von Futterprotein, das einer MAILLARD-Reaktion ausgesetzt war, nach den Ergebnissen der enzymatischen Hydrolyse in vitro durch Zulagen von Arginin, Histidin, Lysin, Methionin und Tryptophan, führte zu einer Verbesserung von Futterverzehr, Wachstum, PER und zu "Normalwerten" der freien Aminosäuren im Plasma bis zu denen der Kontrollgruppe. Lipideinlagerungen in der Leber waren histologisch nicht mehr darstellbar. Hieraus ist eine Bestätigung für die Anwendbarkeit der enzymatischen Hydrolyse in vitro zur Kontrolle von Verminderungen der Proteinqualität und deren Ausgleich abzuleiten.

Die Prüfung von Veränderungen des Leberfettgehaltes wird als empfindlicher Parameter zusätzlich zur Bestimmung des PER oder anderer Indices für die Beurteilung der Qualität von Proteinen im Tierversuch empfohlen.

6. Literaturverzeichnis

- ACHEAMPOLG-MENSAK, D.K., and D.C. HILL:
Nutr.Rep.Internat. 2, 9 (1970)
- ANDERSON, H.L., N.J.BENEVENGA, and A.E. HARPER:
J.Nutr. 97, 463 (1969)
- AOYAMA, Y., A.YOSHIDA, and K.ASHIDA:
J.Nutr. 97, 348 (1969)
- BALDWIN, R.R., J.R. LOWRY, and R.J. THIESSEN:
Food Res. 16, 107 (1951)
- BEESTON, A.W., and H.J. CHANNON:
Biochem.J. 30, 280 (1936a)
- BEESTON, A.W., H.J. CHANNON, J.V. LOACH, and H.WILKINSON:
Biochem.J. 30, 1040 (1936b)
- BENTON, D.A., A.E. HARPER, M.E. WINJE, and C.A. ELVEHJEM:
J.Biol.Chem. 214, 677 (1955)
- BERG, G.: Das Fettsäuremuster der Fettleber;
Fettstoffwechsel 3: Fettleber; S. 22-24
Pallas Verlag, München 1967
- BERRY, R.E., + J.H. TATUM:
J.Agric.Food Chem. 13, 588 (1965)
- BEST, C.H., and M.E. HUNTSMAN:
J.Physiol. 75, 405 (1932)
- BEST, C.H., and M.E. HUNTSMAN:
J.Physiol. 83, 255 (1935)
- BEST, C.H., and J.H. RIDOUT:
J.Physiol. 95, 489 (1940)
- BJARNSON, J., and K.J. CARPENTER:
J.Nutr. 24, 313 (1970)
- BÖHLE, E.: Gastroenterologie 1, 1 (1969)
- BOLDOROVICH, H.A., P.FRIEDEL, V.KRAMFL, J.A.RENNER,
F.W. SHEPPARD, and M.A.GIANTURCO:
J.Agric.Food Chem. 15, 1093 (1967)
- BORMAN, A., T.R.WOOD, H.C.BLACK, E.G.ANDERSON, M.J.OESER-
LING, M.WOMACK, and W.C. ROSE:
J.Biol.Chem. 166, 585 (1946)

- BRODIE, B.B., and R.P. MAICKEL:
Ann.N.Y. Acad.Sci. 104, 1049 (1963)
- BRÜGGEMANN, J., und H.ERBERSDOBLER:
Z.Lebm.Unters.u.Forsch. 137, 137 (1968)
- BRÜHL, W.: Med. Welt 2, 1526 (1965)
- CAIN, H.: Über die Fettleber aus morphologischer Sicht;
Fettstoffwechsel 3: Fettleber; S. 5-11
Pallas Verlag, München 1967
- CAMPBELL, J.A.: Methodology of Protein Evaluation, Nutrition
Document, R 10/ Add. 27, WHO, FAO, UNICEF,
PAG, New York (1961)
- CARPENTER, K.J., and G.M. ELLINGER:
Biochem.J. 61, 11 (1955)
- CARPENTER, K.J., G.M. ELLINGER, M.I. MUNRO, and E.J. ROLFE:
Brit.J.Nutr. 11, 162 (1957)
- CAVALLI-SFORZA, L.: Biometrie-Grundzüge biologisch-metho-
discher Statistik
Fischer Verlag, Stuttgart 1969, S. 75-80
- CHANNON, H.J., and H. WILKINSON:
Biochem.J. 29, 350 (1935)
- CHANNON, H.J., M.C. MANIFOLD, and A.P. PLATT:
Biochem.J. 32, 969 (1938)
- CHEEKE, R.R., and D.E. STANGEL:
Nutr.Rep.Int. 3, 85 (1971)
- COLE, A.S., and D.P. SCOTT:
Brit.J.Nutr. 8, 125 (1954)
- CZOK, G.: Z.f.Ernährungswiss. 10, 103 (1970)
- DADDI, L.: Arch.ital.Biol. 26, 142 (1896)
- DAHME, E., und E. WEISS: Grundriss der speziellen patho-
logischen Anatomie der Haustiere. S. 158-159
Ferd. Enke Verlag - Stuttgart 1968
- DANEHY, J.B., and W.W. PIGMAN:
Adv.Food Res. 3, 241 (1951)
- DARKEN, M.A.: Pharmacol.Rev. 16, 223 (1964)
- DAVIDSON, B.K., and L.F. WIGGENS:
Chem.Ind. (London) 37, 982 (1956)
- DAWES, J.W., + R.A. EDWARDS:
Chem.Ind. (London) 53, 2203 (1966)

- DESHFANDE, P.D., A.E. HARPER, and C.A. ELVEHJEM:
J.Biol.Chem. 230, 327 (1958)
- DÜMMER, H.W.: Untersuchungen zur Aminosäureverfügbarkeit
bei hitzegeschädigten Proteinen.
I. Erhitzung von Protein allein und mit Glukose.
Dissertation; München 1970
- DUSTIN, J.P., C.CZAJKOWSKA, S.MOORE, and E.J. BIGWOOD:
Anal.Chim.Acta 9, 256 (1953)
- DU VIGNEAUD, V., J.P.CHANDLER, M.COHN, and C.BROWN:
J.Biol.Chem. 134, 787 (1940)
- ELDRD, N.R., and G. RODNEY:
J.Biol.Chem. 162, 261 (1945)
- ELLIS, G.P., and J. HONEYMAN:
Adv. Carbohydrate 10, 95 (1955)
- ERBERSDOBLER, H.: Untersuchungen zur analytischen und
physiologischen Charakterisierung der Amino-
säureschädigung bei Hitzebehandlung von Nah-
rungs- und Futtermitteln.
Habilitationsschrift, München 1967
- ERBERSDOBLER, H., und H. ZUCKER:
Milchwissenschaft 21, 564 (1966)
- ERBERSDOBLER, H., I.GUNSSER, und G. WEBER:
Zbl.Veterinärmed.Reihe A 17, 573 (1970)
- EVANS, R.J., and H.A. BUTTS:
J.Biol.Chem. 175, 15 (1948)
- EVANS, R.J., and H.A. BUTTS:
J.Biol.Chem. 178, 543 (1949)
- FARBER, E.: Gastroenterology 50, 137 (1966)
- FISHER, H., and R.SHAPIRO: J.Nutr. 75, 395 (1961)
- FLETCHER, K.: Am.J.Clin.Nutr. 19, 170 (1966)
- FLORES, H., W.SIERALTA, and F. MONCKEBERG:
J.Nutr. 100, 375 (1970)
- FORD, J.E.: Brit.J.Nutr. 14, 485 (1960)
- FREIMUTH, U., und A. TRÜBSBACH: Nahrung 12, 887 (1968)
- FREIMUTH, U., und A. TRÜBSBACH: Nahrung 13, 199 (1969a)
- FREIMUTH, U., und A. TRÜBSBACH: Nahrung 13, 207 (1969b)

- GHOSHAL, A.K., A.J.MONSERRAT, E.A.PORTA, and W.S.HARTROFT:
Exp.Molec.Path. 12, 31 (1970)
- GLYNN, K.P., A.F.CAFARO, C.W.FOWLER, and W.W. STEAD:
Ann.Int.Med. 72, 525 (1970)
- GOLDMAN, I.M., J.SEIBL, I.FLAMMENT, F.GAUTSCHI, M.WINTER,
B.WILLHALM, und M. STOLL:
Helv.Chem.Acta 50, 694 (1967)
- GREAVES, E.O., A.F. MORGAN, and M.K. LOVEEN:
J.Nutr. 16, 115 (1938)
- GREENSTEIN, J.P., M.WINITZ, P.GULLINO, and S.M.BIRNBAUM:
Arch.Biochem.Biophys. 59, 301 (1955)
- GULLINO, P., M.WINITZ, S.M. BIRNBAUM, M.C.OTEY, J.CORNFIELD,
and J.P. GREENSTEIN:
Arch.Biochem.Biophys. 58, 253 (1955)
- HAGGARD, J.H., and P.F. PARKS: J.Nutr. 100, 965 (1970)
- HANDSCHUHMACHER, R.E., W.A.CREASEY, J.JAFFE, C.A.PASTER-
NAK, and L.HANKIN:
Proc.Nat.Acad.Sci.(Was.) 46, 178 (1960)
- HANNAN, R.S., and C.H. LEA: Biochim.et Biophys.Acta 9, 293
(1952)
- HARADA, N., and S. MOGI: Agric.Biol.Chem.(Tokyo) 30, 274
(1966)
- HARADA, N., M.KURAHASHI, and M.HAGA:
Agric.Biol.Chem. (Tokyo) 33, 168 (1969)
- HARPER, A.E.: Am.J.Clin.Nutr. 6, 242 (1958)
- HARPER, A.E.: J.Nutr. 68, 405 (1959)
- HARPER, A.E., W.J.MONSON, D.A.BENTON, and C.A.ELVEHJEM:
J.Nutr. 50, 383 (1953)
- HARPER, A.E., D.A. BENTON, M.E.WINJE, and C.A.ELVEHJEM:
J.Biol.Chem. 209, 159 (1954)
- HARPER, A.E., W.J.MONSON, D.A.BENTON, M.E.WINJE, and
C.A.ELVEHJEM: J.Biol.Chem. 206, 151 (1954a)
- HARPER, A.E., and Q.R. ROGERS: Proc.Nutr.Soc. 24, 173
(1965)
- HARPER, A.E., and Q.R. ROGERS: Am.J.Physiol. 210, 1234
(1966)
- HARPER, A.E., N.J.BENEVENGA, and R.M.WOHLHUETER:
Physiol.Rev. 50, 428 (1970)

- HAWK, E.A., and C.A. ELVEHJEM: J.Nutr. 49, 459 (1953)
- HENDRICKSON, R.L., D.E.BRADY, C.W.GEHRKE, and R.F.BROOKS:
Food Technol. 9, 290 (1955)
- HEPBURN, F.N., and W.B. BRADLEY: J.Nutr. 84, 305 (1964)
- HERXHEIMER, G.: D.Med.Woch. S. 607 (1901)
- HEYNS, K., und H.PAULSEN: Über die chemischen Grundlagen
der MAILLARD-Reaktion in: Veränderungen der
Nahrung durch industrielle und haushaltsmäßige
Verarbeitung. - Wiss.Veröff.d. DGE 5, 15-42
Darmstadt 1960
- HIRATA, Y., T.KAWACHI, and T.SIGIMURA: Biochim.Biophys.
Acta 144, 233 (1967)
- HODGE, J.E.: Agric.Food Chem. 1, 928 (1953)
- HØLTERMAND, A.: Stärke 18, 319 (1966)
- HORN, M.J., H.LICHTESTEIN, and M.WOMACK:
J.Agric.Food Chem. 16, 741 (1968)
- HORNING, M.G., and H.C.ECKSTEIN: J.Biol.Chem. 155, 49
(1944)
- IWAMOTO, A., E.A.HELLERSTEIN, and D.M.HEGSTED:
J.Nutr. 79, 488 (1963)
- KIELY, P.J., A.C.NOWLIN, and J.H.MORIARTY:
Cereal Sci. 5, 273 (1960)
- KLAIN, G.J., D.A.VAUGHN, and L.N.VAUGHN: J.Nutr. 78, 359
(1962)
- KLAIN, G.J., and D.A. VAUGHN: Fed.Proc. 22, 862 (1963)
- KLAVINS, J.V.: Brit.J.exp.Path. 44, 516 (1963)
- KOEHLER, P.E., M.E.MASON, and J.A.NEWELL:
J.Agric.Food Chem. 17, 393 (1969)
- KOFRANYI, E., F.JEKAT, K.BRAND, K.HACKENBERG, und B.HESS:
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 350, 1401 (1969)
- KOYUMDJISKY, E., and D. ORTH: Oral.Surg. 17, 104 (1964)
- KRUG, E.: Veränderungen der Nahrung durch industrielle
und haushaltsmäßige Verarbeitung
Diskussionsbeitrag zu K.LANG: Denaturierung der
Nahrungsproteine und Zerstörung von Aminosäuren
durch die thermische Behandlung von Lebens-
mitteln. Wiss.Veröff.d.DGE Bd.5, S. 75-76,
Darmstadt 1960

- KUMTA, U.S., and A.E. HARPER: Proc.Soc.exp.Biol. 110, 512 (1962)
- LANG, K., E.KRUG, W.PRELLWITZ, E.SCHÄFFNER, und W.KIECKEBUSCH: Int.Z.f.Vitaminforsch. 30, 181 (1960)
- LANG, K., W.KIECKEBUSCH, K.H.BÄSSLER, W.GRIEM, und G.CZOK: Z.f.Ernährungswiss. 10, 97 (1970)
- LANG, K., und H.BICKEL: Z.f.Ernährungswiss. 10, 153 (1970)
- LANGE, H.J.: Umsetzungen beim Lagern von Lebensmittelgemischen aus Trockentomaten und anderen Komponenten. Nichtenzymatische Bräunung bei Tomaten. Dissertation; Berlin 1961
- LEA, C.H., and R.S. HANNAN: Biochim.Biophys.Acta 5, 433 (1950)
- LEUNG, P., Q.R.ROGERS, and A.E.HARPER: Fed.Proc. 23, 185 (1964)
- LEWIS, B., J.D.L.HANSEN, W.WITTMAN, L.H.KRUT, and F.STEWART: Am.J.Clin.Nutr. 15, 161 (1964)
- LIEBER, C.S.: Adv.Int.Med. 14, 869 (1968)
- LIEBER, C.S., and R. SCHMID: J.Clin.Invest. 40, 394 (1961)
- LILLIE, R.D., and L.L.ASHBURN: Arch.Path. 36, 432 (1943)
- LITWACK, G., L.V.HANKES, and C.A.ELVEHJEM: Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 81, 441 (1952)
- LOMBARDI, B., P.PANI, and F.F.SCHLUNK: J.Lipid Res. 9, 437 (1968)
- LYMAN, R.L., C.R.COOK, and M.A.WILLIAMS: J.Nutr. 82, 432 (1964b)
- LYMAN, R.L., S.THENEN, and C.R.COOK: Proc.Soc.exp.Biol. 117, 696 (1964a)
- MACDONALD, I., J.D.L.HANSEN, and B.BRONTE-STEWART: Clin.Sci. 24, 55 (1963)
- MAILLARD, L.C.: Compt.rend.soc.biol. 154, 66 (1912)
- MAILLARD, L.C.: Compt.rend.soc.biol. 155, 1554 (1912)
- MAILLARD, L.C.: Compt.rend.soc.biol. 156, 1159 (1913)
- MAILLARD, L.C.: Ann.chim. 5, 258 (1916)
- MAILLARD, L.C.: Ann.chim. 7, 111 (1917)
- MARION, J.P., F.MUGGLER-CHAVANT, R.VIVIANI, J.BRICOUT, D.MEYMOND, and R.H.EGLI: Helv.Chem.Acta 50, 1509 (1967)

- LASOLI, M.E., E. JOHNSON, and M. MARSHING:
J. Agric. Food Chem. 14, 454 (1967)
- MAIER, F.: Z.w.M. 20, 409 (1904)
- MAURON, J., F. MATIU, E. BUJARD, and R.H. EGLI:
Arch. Biochem. Biophys. 59, 433 (1955)
- MAURON, J.: Nat. Acad. Sci. - Nat. Res. Council (Was.) 843,
425 (1961)
- McLAUGHLAN, J.M., and W.I. ILLMAN: J. Nutr. 93, 21 (1967)
- MEIER-RUGE, W., und P. EBERT: Dtsch. Ges. Path. 46. Tagung
S. 220 (1962)
- MENDEN, E.: Möglichkeiten und Folgen einer Beeinflussung
der Proteinqualität bei der industriellen Ver-
arbeitung. Ergebnisse Landwirtschaftlicher
Forschung an der Justus Liebig-Universität
Gießen, Heft XI, 303-308 (1970)
- MENDEN, E., und H.-D. CREMER: Nutr. Dieta 8, 188 (1966)
- MENDEN, E., und H.-D. CREMER: Newer Methods of Nutr. Biochem. 4,
123 (1970)
- MENDEN, E., F.H. KRATZER, und E. CORNELIUS:
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1315 (1970)
- MORGAN, F.A.: J. Biol. Chem. 90, 771 (1931)
- MORRISON, A.B., E.J. MIDDLETON, and J.M. McLAUGHLAN:
Can. J. Biochem. 39, 1675 (1961)
- NAKANO, K., T. KISHI, N. KURITA, and K. ASHIDA:
J. Nutr. 100, 827 (1970)
- NARAYANA RAO, M., and J.M. McLAUGHLAN:
J. Ass. off. analytic. Chem. 50, 707 (1967)
- NESHEIM, M.C., and K.J. CARPENTER: Brit. J. Nutr. 21, 399
(1967)
- NINO-HERRERA, H., A.E. HARPER, and C.A. ELVEHJEM:
J. Nutr. 53, 469 (1954)
- O'DELL, B.L., and W.O. REGAN: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112,
336 (1963)
- OGURA, M.: Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 30, 226 (1966)
- OGURA, M., and N. NAKAMURA: Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 27, 484
(1963)
- OGURA, M., H. TANAKA, and A. ITO: Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 32,
920 (1968)

- PATTON, A.R., E.G.HILL, and E.M.FOREMAN: Science 107, 623 (1947)
- PEARSON, A.M., B.G.TARLADGIS, M.E.SPOONER, and J.R.QUINN: J.Food Sci. 31, 184 (1966)
- PENG, Y., and A.E. HARPER: J.Nutr. 100, 429 (1970)
- PIEZ, K.A., and L. MORRIS: Anal.Biochem. 1, 187 (1960)
- POMMERANZ, Y., J.SHELLENBERGER: J.Agric.Food Chem. 9, 428 (1961)
- PORTA, A.E., and W.S. HARTROFT: Am.J.Clin.Nutr. 23, 447 (1970)
- RAO, P.B.R., H.W. NORTON, and B.C.JOHNSON: J.Nutr. 73, 38 (1961)
- RECKNAGEL, R.C., B.LOMBARDI, and M.C.SHOTZ: Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 104, 608 (1960)
- RENNER, R., D.R.CLANDININ, A.B.MORRISON, and A.R.ROBBLEE: J.Nutr. 50, 487 (1953)
- REYNOLDS, T.M.: Adv.Food Res. 12, 1 (1963)
- RIESEN, W.H., D.R.CLANDININ, C.A.ELVEHJEM, and W.W.CRAVENS: J.Biol.Chem. 167, 143 (1947)
- RIZZI, G.P.: J.Agric.Food Chem. 15, 549 (1967)
- RÖWE, K., und G.TRESER: Mat.Med.Nordmark XIV, 45 (1962)
- ROHEIM, P.S., S.SWITZER, A.GIRARD, and H.A.EDER: Lab.Invest. 15, 21 (1966)
- ROKITANSKY, (1839): Zit.n. H.THALER: D.Internist 7, 21 (1966)
- ROSE, W.C.: Science 86, 298 (1937)
- ROTHER, M., und I.VOIGT: Nahrung 7, 50 (1963)
- RUBIN, E., and CH.S.LIEBER: Amer.J.Medic. 45, 1 (1968)
- RUISSEAU, du, J.P., J.P.GREENSTEIN, M.WINITZ, and S.M. BIRNBAUM: Arch.Biochem.Biophys. 64, 335 (1956)
- SANCHEZ, A.: Dissertation Abstr. (B) 29, 3372B - 3373B (1969)
- SAUBERLICH, H.E.: Fed.Proc. 12, 263 (1953)
- SAUBERLICH, H.E.: J.Nutr. 75, 61 (1961)
- SCHEIG, R.: Amer.J.Clin.Nutr. 23, 467 (1970)
- SIDRANSKY, H., E.VERNEY, and R.F.EGAN: Lab.Invest. 16, 858 (1967)

- SINGAL, S.A., and H.C.ECKSTEIN: Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 41, 512 (1939)
- SINGAL, S.A., S.J.HAZAN, V.P.SYDENSTRICKER, and J.M.LITTLEJOHN: J.Biol.Chem. 200, 867 (1953)
- STADTMAN, F.H., C.O.CHICHESTER, and G.J.MACKENNEY: J.Am.Chem.Soc. 74, 3194 (1952)
- STEWART, C.P.: The effect of heat upon the nutritional value of protein. in: Veränderungen der Nahrung durch industrielle und haushaltmäßige Verarbeitung. Wiss.Veröff. d.DGE Bd. 5, S. 45-49 Darmstadt 1960.
- STOCKLAND, W.L., J.R.MEADE, and A.L.MELLIÈRE: J.Nutr. 100, 925 (1970)
- SURE, B.: Agric.Food Chem. 1, 82 (1953)
- TARNOWSKY, W.: Störungen des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels als mögliche Ursachen der Fettleber. S. 45-50, Fettstoffwechsel 3: Fettleber Pallas Verlag; München 1967
- TARR, H.L.A., and R.E.A.GADD: J.Fish.Res.Bd.Can. 22, 755 (1955)
- THALER, H.: Der Internist 7, 21 (1966)
- THEUER, D.: Deutsch.Gesundhw. 23, 2113 (1968)
- TREADWELL, C.R., M.G.GROOTHIUS, and H.C.ECKSTEIN: J.Biol.Chem. 142, 653 (1942)
- TREADWELL, C.R., H.C.TIDWELL, and J.H.GAST: J.Biol.Chem. 156, 237 (1944)
- TUCKER, H.F., and H.C.ECKSTEIN: J.Biol.Chem. 121, 479 (1937)
- TUCKER, H.F., and H.C.ECKSTEIN: J.Biol.Chem. 126, 117 (1938)
- TUCKER, H.F., C.R.TREADWELL, and H.C.ECKSTEIN: J.Biol.Chem. 135, 85 (1940)
- VALLE-RIESTRA, J., and R.H.BARNES: J.Nutr. 100, 873 (1970)
- VANGALA, R.R., and E.MENDEN: Z.f.Lebm.Unters.u.Forsch. 142, 195 (1970)
- VIVIANI, R., and A.M.SECHI: Experientia 19, 88 (1963)
- VIVIANI, R., A.M.SECHI, and G.LENAZ: J.Lipid Res. 7, 473 (1966)
- WEAST, E.O., M.GROODY, and A.F.MORGAN: Amer.J.Physiol. 152, 286 (1948)

- WILFRED, G., and T.N. SEKHARA VARMA: Biochim.Biohys.
Acta 188, 442 (1969)
- WINDMÜLLER, H.G.: J.Biol.Chem. 239, 530 (1964)
- WINJE, M.E., A.E.HARPER, D.A.BENTON, R.E.BOLDT, and
A.A.ELVEHJEM: J.Nutr. 54, 155 (1954)
- WOLFROW, M.L., R.C.SCHLICHT, A.W.LANGER jr., and C.S.ROONEY:
J.Am.Chem.Soc. 75, 1013 (1953)
- WOOD, T.: J.Sci.Food Agric. 12, 61 (1961)
- YAMASHITA, M., M.FUJIMAKI, and Y.SAKURAI: Agric.Biol.Chem.
(Tokyo) 9, 1047 (1967)
- YOSHIDA, A., and A.E.HARPER: J.Biol.Chem. 235, 2586 (1960)
- YOSHIDA, A., K.ASHIDA, and A.E.HARPER: Nature 189, 917 (1961)
- YOSHIDA, A., and K.ASHIDA: Agr.Biol.Chem. (Tokyo) 26, 56
(1962)
- YOSHIDA, A., and A.E.HARPER: Agr.Biol.Chem. (Tokyo) 33,
1097 (1969)
- ZOLLINGER, H.U.: Pathologische Anatomie Bd. I Allgemeine
Pathologie S. 28 - Georg Thieme Verlag
Stuttgart 1968

Herrn Prof. Dr. H.-D. Cremer möchte ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr. E. Menden für die Überlassung des Themas, für die Betreuung der Arbeit und für die vielen wertvollen Anregungen, die die Arbeit sehr gefördert haben.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. F.H. Kratzer für die fachliche Unterstützung sowie Frau Prof. Dr. Ito für ihre Hilfe bei der Auswertung des histologischen Teils der Arbeit.

LEBENS LAUF

- 10.2.1945 geboren in Uttum, Kreis Norden
- 1951-1954 Besuch der Volksschule in Uttum
- 1954-1955 Besuch der Volksschule in Eltville
- 1955-1964 Besuch der Elly Heuss-Schule, Realgymnasium, Wiesbaden; Abitur
- 1.4.1964- Besuch der Landfrauenschule Bad
30.9.1964 Weilbach (Reifensteiner Verband)
- 1.10.1964- Praktikum im Städtlichen Chemischen
30.3.1965 Untersuchungsamt in Wiesbaden
- 1965-1969 Studium der Haushalts- und Ernährungswissenschaften an der Justus Liebig-Universität in Gießen
- 16.4.1969 Diplomprüfung in Haushalts- und Ernährungswissenschaften, Fachrichtung: Ernährungswissenschaften
- Seit 1.5. Doktorandin am Institut für Ernährungswissenschaft I in Gießen
1969

